



**Segundo Congreso Peruano de
Mejoramiento Genético y
Biotecnología Agrícola**

Proceeding

**UCSM, Arequipa-Perú
28-30 de mayo
2014**

CONFERENCIAS

Día Miércoles 28

El mejoramiento Genético de Plantas y la Biotecnología

Dr. Raul Blas Sevillano

Univ. Nacional Agraria La Molina UNALM - Presidente Honorario del Congreso

Los Recursos Genéticos en el Perú

Dr. Ricardo Sevilla Panizo

UNALM -INIA

Mejoramiento de la calidad nutritiva de cebada (*Hordeum vulgare*) mediante inducción de Mutaciones"

Dra. Luz Gómez UNALM

Aplicaciones de la Biotecnología

Dr. Jaime Lazarte

Día Jueves 29 de mayo

"Mejoramiento genético para resistencia a enfermedades y plagas en los cultivos alimenticios: frijol papa, plátano y trigo

Dr. Rodomiro Ortis

Swedish University of Agricultural Sciences

La Red Latinoamericana y del Caribe de Biotecnología Agrícola y Forestal (REDBIO) y REDBIO 2016-Perú

Dr. William Roca

Presidente de REDBIO

Demanda mundial de maíz y actividades de colaboración del CIMMYT en Sudamérica.

Dr. Luis Narro

Caracterización y Conservación de Germoplasma de Camote

Genoveva Rossell Montesinos

Centro Internacional de la Papa

Oportunidad de generar variedades peruanas de dos cultivos de agro exportación: alcachofa y esparrago

Dr. Carlos Quirós

University of California, Davis

Día viernes 30 de mayo

La utilización de variedades mejoradas en un mercado competitivo y la aplicación de Sistemas de Información al Fitomejoramiento."

Francisco Bermudez Perez

ZAYINTEC España

Biotecnología Moderna y de Punta para el desarrollo y uso sostenible de la Biodiversidad:

Productividad de la Agricultura y seguridad alimentaria y nutricional

Dr. Alexander Grobman Tversqui

Genetista Consultor Internacional. Empresas Semilleras

Uso Múltiple y Valorización de Bosques Nativos

Dr. Rubén Coirini

Univ. Córdoba Argentina

Interacción Genotipo -Medio ambiente

Dra. Julia Carrera

Univ. De Córdoba-Argentina

Bioseguridad en el Perú y los Resultados del Proyecto LAC-Biosafety

Dr. Enrique N. Fernández-Northcote.

UNALM-Coordinador Nacional Proyecto Regional Bioseguridad - LAC (FMAM-BM)

LAC - Biosafety (GEF-WB)

Area de Semillas

M.Sc. Abel Humpire

Marco Regulatorio de Semillas en Perú

INIA

Organiza:

Facultad de Cs. Farmacéuticas Bioquímicas y Biotecnológicas UCSM
CONCYTEC

Colaboran: Fac. de Cs. Biológicas y Agropecuarias-UNSA

Instituto Nacional de Innovacion Agraria INIA

Programa de **Ingeniería Biotecnológica** de la Facultad de Cs. Farmacéuticas
Bioquímicas y Biotecnológicas de Universidad Católica de Santa María,

Comité Central:

Decano de la Fac. de Cs. Farmacéuticas Bioquímicas y Biotecnológicas
Jaime Cárdenas García Ph.D

Director Programa profesional de Ingeniería Biotecnológica
Jose Villanueva Salas Ph D

Jefe del departamento de Cs, Farmacéuticas Bioquímicas y Biotecnológicas
Dr. Alberto Briceño Ortega

Comité de organización:

Presidente Honorario: Raul Blas Sevillano(UNALM)

Presidente: M.Sc.Roxana Bardales Alvarez (UCSM)

Vice-presidente:Dr. Alberto Anculle Arenas(UNSA)

Secretaria: Dra. Rosario Valderrama valencia (UCSM)

Tesorera: M.Sc. Cinthia Córdoba Barrios(UCSM)

Comité Científico

Dr. Ricardo Sevilla Panizo

Recursos Genético

Dr. Raúl Blas Sevillano

Biología Molecular

Dr. Miguel Moran Robles

Biotecnología Vegetal

Dr. Aquilino Álvarez Cáceres

Mejoramiento Genético de Cultivos Andinos

Dr. Félix Camarena Mayta

Mejoramiento Genético de Leguminosas y Granos

Dra. Luz Gómez Pando

Mejoramiento Genético de Cereales

Dr. Julián Chura

Mejoramiento Genético del Maíz

M.Sc. Mack Pinchi.

Mejoramiento Genético de Cultivos Amazónicos

Dr. Alberto Anculle Arenas

Mejoramiento Genético de Hortalizas

Comité Ejecutivo

Estudiantes de Ingeniería Biotecnológica, Egresados de Ingeniería Biotecnológica.
Egresados y profesionales de otras carreras.

-
-
-

SEGUNDO CONGRESO PERUANO DE MEJORAMIENTO GENÉTICO Y BIOTECNOLOGÍA AGRÍCOLA

Presentación

Es un hecho indiscutible que las necesidades de alimentos y otros productos agrícolas serán mayores en el futuro. Esa tendencia, unida al crecimiento poblacional que seguirá alto en los países en vías de desarrollo como el Perú, creará situaciones críticas por el aumento de precios que se genera cuando aumenta la demanda y no aumenta paralelamente la producción. En las actuales circunstancias no se espera en el país un aumento general de la producción; el aumento en productividad se dará como ya es evidente en los cultivos para exportación, acompañados de una fuerte inversión. La situación es dramática si se considera que la inversión en genética es de menor cuantía y de mayor impacto que la inversión en otros factores de la producción. Por eso el interés en conocer, como está invirtiendo el país en la generación de variedades mejoradas y el rol que éstas cumplen en la tecnificación del agro. La presente publicación presenta los resultados de los trabajos que se presentaron en el Segundo Congreso Peruano de Mejoramiento Genético y Biotecnología Agrícola. La primera impresión es decepcionante; muy poco trabajo de mejoramiento y selección se hace en el país. Pero un análisis más profundo de la información presentada muestra tendencias que son positivas. Los cultivos tradicionales que tienen un impacto muy fuerte en la alimentación, como el arroz, la papa y el maíz acusan en algunas regiones altos niveles de productividad, algunos casos compiten con la mayor productividad mundial. El problema son las especies que cultivan los agricultores más pobres del país, en áreas marginales, cuya productividad es limitada por una serie de factores de difícil control. Cientos de cultivos nativos del país que en su conjunto hacen del Perú un país mega diverso, se desperdician por su bajo nivel de productividad y vulnerabilidad a enfermedades y plagas y a las condiciones ambientales adversas. Esas parecen haber recibido en este Congreso una atención preferente. El mejoramiento de esos cultivos requiere de estrategias diferentes a las convencionales y decisiones que van más allá de la escogencia del método de mejoramiento más eficiente. Antes de aplicar los métodos de mejoramiento hay que conocer aspectos intrínsecos del cultivo, como la biología floral, su fenología, su adaptación, sus parientes silvestres; aspectos relacionados con el entorno: culturales, ecológicos, socio-económicos; y aspectos que aseguren la conservación de las especies y la sostenibilidad ambiental. Mucho de eso se encontrará, aunque todavía a un nivel poco perceptible, entre los trabajos presentados. Se nota también una tendencia interesante que acerca la biotecnología y el mejoramiento genético con el objetivo común de generar variedades mejoradas adaptadas a nuestras condiciones limitantes y para utilizar la diversidad de las especies en forma sostenible. Se espera que con el tiempo esa tendencia se haga más evidente. La lectura de los trabajos científicos que en forma compacta se presentan en esta publicación, constituye una verdadera línea de base para, superando las condiciones que causaron la crisis de la especialidad de mejoramiento genético, el país retome la vía de una verdadera tecnificación del agro nacional.

Roxana Bardales Alvarez
Arequipa, Mayo 2014

Contenido

EVALUACIÓN DEL RENDIMIENTO DE 6 LÍNEAS AUTOFEUNDADAS S ₃ DE SACHA INCHI (<i>Plukenetia volubilis</i> L.) EN LA REGIÓN SAN MARTÍN	10
SELECCIÓN DE PLANTAS PROMISORIAS DE CAMU CAMU (<i>MYRCIARIA DUBIA</i> (KUNTH) MCVAUGH) DE LA ESTACIÓN EXPERIMENTAL DEL -IIAP-UCAYALI	12
Avances en el Estudio de Diversidad de una Colección de Oca (<i>Oxalis tuberosa</i> Mol.) de Cusco, Perú.	14
AVANCES EN EL ESTUDIO DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA DE OCAS CULTIVADAS (<i>Oxalis tuberosa</i> Mol.) DE LA REGIÓN CAJAMARCA.....	16
Mejoramiento de la asociación con habas en la Variedad de Maíz PMD-638 tolerante al frío, para un sistema de producción más sostenible en la región alto-andina.	19
DIVERSIDAD DE “CULTIVARES LOCALES DE OLLUCO (<i>Ullucus tuberosus</i> C.) DE LA REGIÓN DE CUSCO	21
ADAPTACIÓN DE 63 LÍNEAS INTRODUCIDAS DE FRÍJOL (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.).....	23
A CONDICIONES DE LA COSTA CENTRAL PERUANA	23
Comportamiento de híbridos dobles con líneas CIMMYT de maíz amarillo duro <i>Zea mays</i> L. en Oxapampa, Pasco, Perú.....	26
COMPORTAMIENTO AGRONÓMICO DE TRES GENOTIPOS DE CAMOTE (<i>Ipomoea batatas</i> Lam.) CON LA APLICACIÓN DE DOS INDUCTORES DE RESISTENCIA SISTEMICA ADQUIRIDA	29
Protección cruzada contra el Virus de la mancha anular del papaya (PRSV) en el cultivo de papaya (<i>Carica papaya</i> L.)	33
Determinación de la Variabilidad de Híbridos (<i>Stevia sp.</i>) mediante el Uso de ISS-PCR.....	35

Polimorfismo en la longitud de fragmentos amplificados (AFLP) en la caracterización de ochenta accesiones de <i>Theobroma cacao</i> L. (cacao) del banco de germoplasma del Instituto de Cultivos Tropicales (ICT).....	38
Cruzas simples y dobles en quinua (<i>Chenopodium quinoa</i> Willd.) usando marcadores moleculares y mayores distancias genéticas.....	43
Propagación vegetativa de rebrotes de café (<i>Coffea arabica</i>) con tres medios enraizamiento y Acido Indolbutírico.....	45
CUATRO MODALIDADES DE MICROINJERTO Y TRES AUXINAS (ANA, AIA, AIB) EN EL MANEJO INVITRO DE PLANTAS DE LIMONERO (<i>Citrus aurantifolia</i> Christm.) Y NARANJO (<i>Citrus sinensis</i> L.).....	49
Multiplicación de plántulas de piña (<i>Ananas comosus</i> L. Merr.) en sistemas de inmersión temporal y aclimatación bajo condiciones de Chanchamayo para su escalamiento.....	52
Avances de caracterización morfológica y molecular de mashua (<i>Tropaeolum tuberosum</i> Ruiz & Pavón) de los departamentos de Cusco y Cajamarca, Perú.....	54
Uso de AFLP para determinar la variabilidad genética de los hongos <i>Moniliophthora roreri</i> y <i>Moniliophthora perniciosa</i> provenientes de seis zonas cacaoteras del Perú, 2012.....	57

Evaluación del rendimiento de 6 líneas autofecundadas S_3 de sachá inchi (*Plukenetia volubilis* L.) en la región san martín

Reynaldo Solís^{1*}, Marlon Pezo¹, Miguel Cruz¹, Danter Cachique¹

¹Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana - San Martín, Perú.
e-mail: *rsolis@iiap.org.pe, jeans.agrof@gmail.com, veintemillacruz@gmail.com,
dcachique@iiap.org.pe

RESUMEN

El presente trabajo de investigación se desarrolló con la finalidad de evaluar el rendimiento de 6 líneas autofecundadas S_3 de sachá inchi bajo un sistema de tutoraje en espalderas y a un distanciamiento entre plantas de 3 x 3 metros. Se empleó un DBCA con 3 bloques y 15 plantas por línea en cada bloque. La línea L1 es la más precoz y la línea L5 es la más tardía. La línea L2 presenta mayor rendimiento por hectárea (2578.7 kg) y tiene gran potencial para ser empleada en el mejoramiento genético del sachá inchi. Las líneas L4 y L5 presentan el menor rendimiento por hectárea (1574.5 y 1618.7 kg respectivamente). El porcentaje de semilla oscila entre 52.91 y 54.12 % mientras que el porcentaje de cáscara oscila entre 45.88 y 47.0 %.

Palabras clave: sachá inchi, líneas autofecundadas S_3 , banco de germoplasma, rendimiento.

ABSTRACT

This research was developed in order to evaluate the performance of six S_3 inbred lines of sachá inchi under tutoring system trellis and a distance between plants of 3 x 3 meters. The statistical design used in the field was a RCBD with 3 blocks and 15 plants per inbred line in each block. The line L1 was the first and L5 was the last line that started flowering and fruiting. The line L2 has higher yield per hectare (2578.7 kg) and has great potential to be used in breeding of sachá inchi. The lines L4 and L5 have the lowest yield per hectare compared to the other treatments (1574.5 and 1618.7 kg, respectively). The seed percentage is between 52.91 and 54.12% while the shell percentage is between 45.88 and 47.09%.

Key words: sachá inchi, S_3 inbred lines, genebank, yield.

INTRODUCCIÓN

El sachá inchi es un cultivo nativo de la Amazonía Peruana y con un alto potencial de rendimiento. Tiene amplia adaptación a diferentes tipos de suelo y buen comportamiento a diversas temperaturas que caracterizan a la Amazonía Peruana (Manco, 2006), por lo que puede ser empleado para la recuperación de áreas degradadas en la región San Martín. El sachá inchi se ha cultivado desde la época prehispánica y la primera mención científica fue hecha en 1980 a consecuencia de los análisis de contenido graso y proteico realizados por Hazan y Stoewesand en el Instituto de Ciencia de los Alimentos de la Universidad de Cornell en Estados Unidos, que demostraron que las semillas presentan altos contenidos de ácidos grasos insaturados y proteínas (Manco, 2006).

Considerando el interés de los productores por contar con una variedad mejorada que asegure altos rendimientos y semillas con altos contenidos de ácidos grasos insaturados, el Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana continúa realizando trabajos de investigación para la selección y evaluación de progenitores como: obtención y evaluación de líneas puras, hibridación, determinación de rendimiento, caracterización química de ácidos grasos presentes en las semillas, caracterización genética molecular, propagación clonal, entre otros (Cachique, 2006; Merino *et al.*, 2008; Corazón-Guivin *et al.*, 2009; Noriega, 2009; Rodríguez *et al.*, 2010; Ruiz-Solsol y Mesén, 2010; Cachique *et al.*, 2011).

El sachá inchi es un cultivo alógamo y los resultados a la fecha nos ha permitido seleccionar 6 líneas autofecundadas S_3 . Cada línea autofecundada está formada por un conjunto de individuos con alto grado de homocigosis. El presente trabajo consiste en el desarrollo de un experimento de investigación adaptativa donde se ha evaluado el rendimiento de 6 líneas autofecundadas S_3 de sachá inchi en las condiciones agroecológicas de Bello Horizonte - San Martín.

MATERIALES Y METODOS

La siembra del material genético se realizó empleando bolsas almacigueras de 0.5 Kg y el sustrato a una relación 2:1:1 de tierra agrícola, arena y humus de lombriz. Los plantones se mantuvieron en vivero durante 45 días. Se colocó 5 Kg de humus de lombriz en la siembra en campo de los plantones y el distanciamiento entre plantas fue de 3 x 3 metros. El diseño estadístico empleado fue un DBCA con 3 bloques y 15 plantas por línea en cada bloque. La cosecha se inició a los 230 días después del transplante (ddt) y se realizó durante 12 meses, evaluándose el rendimiento de las líneas. Para el análisis estadístico se empleó el programa estadístico SAS 9.0 y la prueba de comparación de medias se realizó de acuerdo a Duncan ($p=0.05$).

RESULTADOS Y DISCUSION

La floración constituye la primera etapa del proceso reproductivo de las plantas superiores y viene a ser un requisito fundamental para que se realice la formación y desarrollo de las semillas. La floración máxima está caracterizada por la presencia de flores pistiladas y estaminadas completas. En el inicio de la fructificación aparecen los primeros frutos cuajados provistos de estilo y estigma. La línea L1 es la más precoz e inició la floración a los 60 ddt y la fructificación a los 100 ddt. La línea L5 es la más tardía e inició la floración a los 74 ddt y la fructificación a los 131 ddt.

En las accesiones del banco de germoplasma de sachá inchi de la Estación Experimental “El Porvenir”, INIA - Tarapoto, la floración ocurre entre los 86 y 139 ddt, el inicio de la fructificación ocurre entre los 119 y 182 ddt y el inicio de las cosechas fluctúa entre los 202 y 249 ddt (Manco, 2006). En Tarapoto en los meses de verano el número de cápsulas de sachá inchi se incrementa y disminuye en los meses de invierno (Arévalo, 1996). Todas las variables de rendimiento están influenciadas por factores genéticos, condiciones edafoclimáticas y balance adecuado de nutrientes y en el análisis de varianza el número de cápsulas resultó no significativo mientras que el peso de cápsulas, diámetro de cápsulas, peso de semillas, diámetro de semillas, peso de 100 semillas, rendimiento por planta y rendimiento por hectárea resultaron estadísticamente significativos. La línea L2 es superior a las demás en las variables de rendimiento y tiene un gran potencial para ser empleada en el mejoramiento genético del sachá inchi. Las líneas L4 y L5 presentan el menor rendimiento por hectárea en comparación con las otras líneas (Cuadro 1). El porcentaje de semilla de las líneas oscila entre 52.91 y 54.12% y el porcentaje de cáscara entre 45.88 y 47.09%.

Línea	Nro. de cápsulas	Peso de cápsulas (gr)	Diámetro de cápsulas (cm)	Peso de semillas (gr)	Diámetro de semillas (cm)	Peso de 100 semillas (gr)	Rendimiento por planta (kg)	Rendimiento por hectárea (kg)
L1	419.2 a	3205.7 ab	4.47 b	1699.2 ab	1.7 b	85.34 b	1.7 ab	1887.8 ab
L2	572.5 a	4333.4 a	4.74 a	2321 a	1.81 a	101 a	2.32 a	2578.7 a
L4	424.5 a	2618.8 b	4.39 bc	1417.2 b	1.68 b	83.14 b	1.42 b	1574.5 b
L5	462 a	2735.4 b	4.25 d	1457 b	1.6 d	78.74 c	1.46 b	1618.7 b
L6	511.4 a	3178.1 ab	4.32 cd	1706.6 ab	1.64 c	83.42 b	1.71 ab	1896.0 ab
L7	541.2 a	3355.2 ab	4.38 c	1775 ab	1.64 c	82.3 bc	1.78 ab	1972.0 ab

Cuadro 1: Pruebas de comparación de medias (Duncan, p=0.05) para la evaluación del rendimiento de 6 líneas autofecundadas S3 de sachá inchi (*Plukenetia volubilis*).

BIBLIOGRAFIA

- Arévalo, G. 1996. El Cultivo de Sachá Inchi (*Plukenetia volubilis* L.) en la Amazonía. Instituto de Investigación Agraria, Proyecto Suelos Tropicales. Lima, Perú. 68 pp.
- Cachique, D.; Rodríguez, A.; Ruiz-Solsol, H.; Vallejos, G.; & Solis, R. 2011. Propagación vegetativa del sachá inchi (*Plukenetia volubilis* L.) mediante enraizamiento de estacas juveniles en cámaras de subirrigación en la Amazonía Peruana. Folia Amazónica 20 (1-2): 95-100.
- Corazón-Guivin, M.; Castro-Ruiz, D.; Chota-Macuyama, V.; Rodríguez, A.; Cachique, D.; Manco, E.; Del Castillo, D.; Renno, J.F. & García-Dávila, C. 2009. Caracterización genética de accesiones Sanmartinenses del Banco Nacional de Germoplasma de sachá inchi - *Plukenetia volubilis* L. (E.E. El Porvenir - INIA). Folia Amazónica 18 (1-2): 23-31.
- Manco, E. 2006. Cultivo de sachá inchi. Instituto Nacional de Innovación Agraria. Tarapoto - Perú. 11 pp.
- Merino, C.; Sotero, V.E.; Del Castillo, D.; Vásquez, G.; Cachique, D. & Vásquez-Ocmín, G. 2008. Caracterización química de nueve ecotipos de *Plukenetia volubilis* L. de los departamentos de Loreto y San Martín. Folia Amazónica 17 (1-2): 39-45.
- Noriega, H. 2009. Estudios de compatibilidad de 5 ecotipos promisorios de sachá inchi (*Plukenetia volubilis* L.) en la región San Martín. Tesis para optar el título de Ingeniero Agrónomo – Universidad Nacional de San Martín. 65 pp.
- Rodríguez, A.; Corazón-Guivin, M.; Cachique, D.; Mejía, K.; Del Castillo, D.; Renno, J.F. & García-Dávila, C. 2010. Diferenciación morfológica y por ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) de especies del género *Plukenetia* (Euphorbiaceae) de la Amazonía Peruana: Propuesta de una nueva especie. Revista Peruana de Biología 17 (3): 325-330.
- Ruiz-Solsol, H. & Mesén, F. 2010. Efecto del ácido indolbutírico y tipo de estacilla en el enraizamiento de sachá inchi (*Plukenetia volubilis* L.). Agronomía Costarricense 34(2): 259-267.

Selección de plantas promisorias de camu camu (*Myrciaria dubia* (Kunth) Mcvaugh) de la estación experimental del -IIAP-Ucayali

Carlos ABANTO RODRIGUEZ¹, Diego GARCIA SORIA¹, José SANCHEZ-CHOY², Ricardo Manuel BARDALES LOZANO³

¹Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana-IIAP Ucayali, ²Universidad Intercultural de la Amazonía-UNIA, ³Empresa Brasileira de pesquisa Agropecuaria-Embrapa Roraima-Brasil

¹cabanto@iiap.org.pe, ¹dgarcia@iiap.org.pe, ²jose.sanchezchoy@yahoo.com, ³rbardaleslozano@yahoo.es

RESUMEN

Camu camu es una fruta nativa de la Amazonía, que llama la atención por el alto contenido de vitamina C (3253.13 mg/100 g de pulpa), está en proceso de domesticación, por lo cual se está seleccionando plantas madre a fin de avanzar significativamente en el proceso de mejoramiento genético de la especie. El objetivo fue evaluar y seleccionar plantas promisorias de camu camu de una base genética de 275 accesos instaladas en la EE del IIAP Ucayali en base a rendimiento de fruta (kg planta⁻¹). Después de 3 años de evaluación las plantas seleccionadas corresponden a los códigos E3-F13; E3-F10; E3-F11; 3B-F1; E3-F7; E3-F14; E3-F8; 3B-F5; E3-F12; P1-F25, sin embargo las plantas E3-F13; E3-F10; E3-F11; 3B-F1 y la E3-F7, presentaron diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) frente a los demás códigos, con un rendimiento de 14 kg de fruto en promedio. Estos resultados son muy alentadores ya que nos permitirá tener un jardín clonal de multiplicación de material selecto para cubrir la demanda de plantones, para las futuras plantaciones en la Región de Ucayali.

ABSTRAC

Camu camu is a fruit native the Amazon, which is notable for the high content of vitamin C (3253.13 mg/100 g pulp), is in the process of domestication, so being selected mother plants to significantly advance in the process of genetic improvement of the species. The objective was evaluate and select promising camu camu plants of a genetic basis for 275 hits installed in EE-IIAP Ucayali, based on fruit yield (kg plant⁻¹). After 3 years of evaluation selected plants correspond to codes E3-F13; E3-F10; E3-F11; 3B-F1; E3-F7; E3-F14; E3-F8; 3B-F5; E3-F12; P1-F25, no clutch plant that stood out was the E3-F13 with 16.5 kg. Plant⁻¹ on average, no clutch the plants E3-F13; E3-F10; E3-F11; 3B- F1 and E3-F7, showed statistically significant differences ($P < 0,05$) compared to the other codes, with a yield of 14 kg of fruit on average. These results are very encouraging as it will allow us to have a garden clonal multiplication of selected material to meet the demand for seedlings for future planting in the Ucayali Region.

INTRODUCCION

Así como el oro, el petróleo, la madera y otras enigmáticas riquezas de la Amazonía, el camu camu es otro regalo, que la naturaleza ofrece a la humanidad (Pinedo *et al.*, 2010). Pertenece a la familia Myrtaceae y fue descrito por primera vez en 1823 por Humboldt, Bonpland e Kunth, como *Psidium dubium* H.B.K. En 1963, Rogers Mc Vaughn reclasifica esta especie para el género *Myrciaria*, pasando entonces a llamarse *Myrciaria dubia* (Kunth) McVaugh (Silva, 2012). Se caracteriza principalmente por ser una fuente importante de vitamina C, debido a su alta concentración de ácido ascórbico (AA) con concentraciones de hasta 3253.13 mg/100 g de pulpa. En el Perú, durante los últimos 15 años, se ha realizado un gran esfuerzo en la investigación de esta especie, lo que ha permitido no sólo su domesticación, sino también la adaptación de su cultivo en zonas inundables y suelos de tierra firme, con excelentes resultados (Abanto *et.*, 2014). Esta especie, tiene gran diversidad genética dispersa en extensas áreas de poblaciones naturales de (*Myrciaria dubia*) en Loreto y de (*Myrciaria floribunda*) en Ucayali. Su diversidad constituye la base para un programa de mejoramiento genético orientado al aprovechamiento eficiente de estas especies (Pinedo, 2001). Pese a la importancia del camu camu y la presencia de variabilidad genética en las poblaciones naturales, aun se tiene limitada cantidad de clones o variedades con características superiores de rendimiento de frutos. En ese contexto el objetivo fue evaluar y seleccionar plantas promisorias de camu camu de una base genética de 275 accesos instaladas en la EE del IIAP Ucayali.

MATERIAL Y METODOS

En el año 2006 se instalaron 275 plantas francas de camu camu procedentes de diferentes accesos de la región Ucayali, fueron plantadas en las áreas adyacentes de los estanques de peces amazónicos a un distanciamiento de 4 m entre plantas. El estudio fue conducido mediante un Diseño de Bloques Completamente al Azar (DBCA) con 3 repeticiones y 1 planta por unidad experimental. Para la selección de las plantas madres promisorias se consideró a plantas precoces cuyo rendimiento tenía que ser igual o superior a 5 kg. planta⁻¹, para ello las plantas fueron evaluadas a partir de los 4 años de edad por un periodo de tres años (2010-2013). Los frutos cosechados fueron pintón maduro y maduro (Figura 2) y para el control del peso de los frutos cosechados se usó una balanza comercial de capacidad para 10 kg. Los datos fueron sometidos a análisis de varianza y las medias de los tratamientos fueron comparadas estadísticamente por la prueba de Tukey a 5% de significancia ($P < 0,05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se observó que el nivel de variabilidad existente en las plantas evaluadas fue altamente heterogénea al estar gobernadas por características genéticas propias por tratarse de plantas francas procedentes de diferentes accesos. En ese sentido de las 275 accesos fueron seleccionadas 10 plantas cuyos códigos son: E3-F13; E3-F10; E3-F11; 3B-F1; E3-F7; E3-F14; E3-F8; 3B-F5; E3-F12 y P1-F25 (Figura 1), las cuales se destacaron por presentar una producción continua encima de los 5 kg.planta⁻¹ y además presentaron un comportamiento más homogéneo, sin embargo, hay que resaltar que las plantas E3-F13; E3-F10; E3-F11; 3B-F1 y la E3-F7, presentaron diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) frente a los demás códigos, con un rendimiento de 14 kg de fruto en promedio. En las 10 plantas seleccionadas se observó también que aún no han alcanzado su máximo nivel de producción, en ese sentido es recomienda seguir con la evaluación continua de rendimiento y de otras características biométricas, para obtener su máxima expresión genética y de esa manera puedan ser incluidas en el programa de mejoramiento genético para su multiplicación en el jardín de propagación clonal.

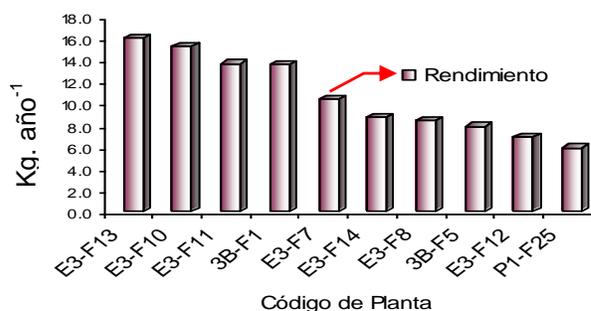


Figura 1. Rendimiento de fruto de las 10 plantas promisorias de camu camu



Figura 2. Frutos de camu camu en estado de maduración pintón maduro y maduro

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Abanto, CR; Chagas, EA; Choy, SJ; Andrade dos Santos, V; Lozano, RMB; Ríos, GS. 2014. Capacidad de enraizamiento de plantas matrices promisorias de *Myrciaria dubia* (Kunth) Mc Vaugh en cámaras de subirrigación. Rev. Ceres, Viçosa, v. 61, n.1, p. 134-140.
- Pinedo, PM; Delgado, VC; Farroñay, PR, Imán, CS; Villacrés, VJ; Faching, ML; Oliva, CC; Abanto, RC; Bardales, LR & Vega, VR. 2010. Camu- Camu (*Myrciaria dubia*- Myrtaceae): Aportes para su Aprovechamiento Sostenible en la Amazonia Peruana. Iquitos, FINCyT. 130p.
- Pinedo, PM; Riva, RR; Rengifo, SE; Delgado, VC; Villacres, VJ; González, CA; Inga, SH; López, UA,; Farroñay, PR; Vega, VR & Linares, BC. 2001. Sistema de producción de camu camu en restinga. Iquitos, IIAP. 143p.
- Silva, SC. 2012. O Gênero *Myrciaria* O. Berg (MYRTACEAE) na Amazônia brasileira. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém. 56p.

Avances en el Estudio de Diversidad de una Colección de Oca (*Oxalis tuberosa* Mol.) de Cusco, Perú.

Sebastian DAVIS BAYLY¹; Daniel HUAMAN¹, Joel FLORES, Andrew RISEMAN², Eduardo JOVEL² & Raúl BLAS¹

¹Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM); ²University of British Columbia, Canadá

¹sdavisbayly@gmail.com, rblas@lamolina.edu.pe,

RESUMEN.

Con la finalidad de conocer la diversidad genética del germoplasma de oca (*Oxalis tuberosa* Mol.) de Cusco -y así proponer mejores estrategias de conservación de sus recursos genéticos-, se colectó y caracterizó (morfológica y molecularmente) 238 entradas provenientes de 12 provincias de la región. La caracterización morfológica de planta se realizó en plena floración y la de tubérculo se llevó a cabo inmediatamente posterior a la cosecha. En el análisis de conglomerados se identificaron 10% de duplicados morfológicos y un total de 214 morfotipos, distribuidos en 50 grupos a un coeficiente de distancia de 0.37, diferenciados principalmente por el color de tubérculo. Estos resultados están siendo contrastados con la caracterización molecular con la técnica de AFLP.

Progress on the study of genetic diversity of oca (*Oxalis tuberosa* Mol.) from Cuzco, Peru

ABSTRACT.

In order to document the genetic diversity of oca (*Oxalis tuberosa* Mol.) from the region of Cusco - and propose better strategies for managing this genetic resource- 212 accessions from 12 provinces were collected and characterized (morphological and molecular). Morphological data were collected twice, during flowering and just after harvest. Based on morphological characterization, there were 23 duplications within the collection. Cluster analysis also indicated approximately 10% duplication from a total of 214 morphotypes -and clustered into 50 small groups at a distance coefficient of 0.37. The primary distinguishing characters were from the tuber. These results will be combined with the AFLP molecular data to further define a genetic management strategy for this crop.

INTRODUCCIÓN

La oca (*Oxalis tuberosa* Mol.)-perteneciente a la familia Oxalidaceae- es después de la papa el tubérculo más importante para la seguridad alimentaria de muchas comunidades campesinas en los Andes centrales, tanto por su valor energético y nutricional como por su capacidad de adaptación a diferentes tipos de suelo y factores ambientales adversos. Con el objetivo de estudiar la diversidad genética de esta especie cultivada en la región de Cusco, se realizó la caracterización morfológica con descriptores consensuados de 238 entradas. Esta investigación pretende servir de herramienta preliminar para la mejor gestión de los recursos genéticos de la oca.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material Genético. La colección de germoplasma se realizó en 12 provincias de Cusco en la chacra o almacén de los campesinos reconocidos por guardar una mayor diversidad en sus comunidades. Incluye cultivares tradicionales de oca tanto de *khaya* como para *wayku*, según la clasificación local de uso.

Caracterización morfológica. Se realizó con 238 entradas sembradas en una parcela demostrativa en la comunidad de Huancco Pillpinto (Calca, Cusco), usando los descriptores consensuados del IPGRI/CIP (2001) durante la floración e inmediatamente posterior a la cosecha. Para los caracteres de coloración se utilizó la tabla de colores de la Real Sociedad Hortícola (RHS, 1995). Adicionalmente se realizaron evaluaciones agronómica-morfológicas preliminares como altura de planta, relación largo/ancho de foliolo, longitud de peciolo y de pedúnculo, diámetro medio de tubérculo, largo de tubérculo, número de ojos/ tubérculo, número de tubérculos/planta, peso de tubérculos/planta y tolerancia a heladas.

Caracterización Molecular. Con 50ng/ul de DNA por entrada, se está haciendo uso de la técnica de AFLPs (Vos *et al*, 1995) con las combinaciones de *primers* más polimórficas encontradas en la caracterización de la colección mantenida por el CIP (Biondi *et al*, 2009): E35ACA/M59CTA, E35ACA/M60CTC, E39AGA/M40AGC, E40AGC/M35ACA, E42AGT/M54CCT, E42AGT/M60CTCE45ATG/M51CCA.

Análisis de datos. Se usaron técnicas univariadas –usando MS-EXCEL- y multivariadas –usando el programa NTSYS v. 2.1. (Rohlf, 2000). Para el análisis de conglomerados se usaron 15 descriptores, dejando de lado el hábito de floración, color de la flor y forma de la corola debido a la poca confiabilidad en la toma de datos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De un total de 238 entradas se encontró 23 casos de mezclas y 10% de duplicados. En base al análisis de conglomerados (cluster) se obtuvo un dendograma con un *Fit criterion* o coeficiente de relación cofenética (Cophenetic *r*) de 0.9253, identificándose 214 morfotipos distintos (a un coeficiente de distancia cero), los cuales están dispuestos en 50 grupos morfológicos a un coeficiente de distancia de 0.37, básicamente diferenciados por el color predominante de la superficie del tubérculo, que va desde el blanco hasta el púrpura grisáceo. Las características morfológicas que predominaron en la colección fueron: tallos aéreos verde amarillentos (60.4%) con pigmentación en las axilas (67%), follaje verde amarillento (49.9%), envés de foliolos verde amarillento (63.7%), pecíolos verdes con estípulas púrpura grisáceo claro (53.5%), sépalos verdes (46.1%), pedúnculo verde amarillento y pedicelo púrpura grisáceo (62.9%). El 9.8% de las entradas no florecieron y de las que presentaron flor, el 32.7% es brevistilia, el 59.1% mesostilia y 5.3% longistilia. En cuanto a los tubérculos, hubo mayor presencia de entradas con color superficial amarillo (36.7%), con color secundario púrpura rojizo (15.1%) distribuido en los ojos (39.6%), con pulpa amarilla (37.1%), con coloración secundaria de pulpa púrpura rojizo (23.7%) en el anillo vascular (47.3%), y tubérculos claviformes (60.8%). El análisis de Correspondencia Múltiple muestra que 3 componentes explican el 76.7% de la variabilidad observada en campo (**Tabla 1**).

Figura 1. Morfotipos de tuberculo

Tabla 1. Valores propios (*Eigen values*) de los primeros 6 componentes (dim), aporte individual (%) y acumulativo (cum%).

dim	value	%	cum%
1	0.46903	43.6	43.6
2	0.246017	22.9	66.5
3	0.109021	10.1	76.7
4	0.069378	6.5	83.1
5	0.049946	4.6	87.8
6	0.046373	4.3	92.1



Agradecimiento: El presente trabajo fue financiado por el proyecto AGROECO, con fondos del Programa Canadiense de Investigación Internacional en Seguridad Alimentaria (CIFSRF).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Biondi, J; Rossel, G.; Zorrilla, C.; Arbizu, C. & Roca, W. 2009. Molecular characterization of the *Oxalis tuberosa* Mol. collection maintained in the CIP's genebank. 15th Triennial ISTRC Symposium.
- IPGRI-CIP. 2001. Descriptores de Oca (*Oxalis tuberosa* Mol.). Instituto Internacional de Recursos Filogenéticos, Roma; Centro Internacional de la Papa, Lima, Perú.
- Rohlf, F. 2000. NTSYS-pc Numerical taxonomy and Multivariate Analysis Systems version 2.01. Exeter, Setasuket, Nueva York, Estados Unidos.
- Royal Horticultural Society (RHS). 1995. Colour chart. Londres, Reino Unido
- Vos, P; Hogers, R; Bleeker, M; Reijans, M; Van De Lee, T; Hornes, M; Frijters, A; Pot, J; Peleman, J; Kuiper, M; Zabeau, M. 1995. AFLP: A new technique for DNA Fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 23:4407-4414.

Avances en el estudio de la variabilidad genética de ocas cultivadas (*Oxalis tuberosa* Mol.) de la región cajamarca

Elena NÚÑEZ¹, Joel FLORES¹ & Andrew RISEMAN², Eduardo JOVEL² & Raúl BLAS¹

¹Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM), Perú; ²University of British Columbia, Canadá
enl_062@hotmail.com, rblas@lamolina.edu.pe

RESUMEN

Con la finalidad de conocer la variabilidad genética de ocas cultivadas de la región Cajamarca, se colectó 143 accesiones y fueron caracterizados con ayuda de los descriptores morfológicos y marcadores moleculares AFLP. De manera preliminar se puede establecer 137 morfotipos diferentes y 6 posibles duplicados dentro de esta colección. El porcentaje de polimorfismo obtenido en el análisis molecular fue de 46 % y el análisis de agrupamiento muestra un 10.9 % de germoplasma duplicado. Estos resultados indican, de manera preliminar una alta variabilidad tanto genética como morfológica en las ocas cultivadas de la región Cajamarca.

Progress on the study of genetic diversity of cultivated Oca (*Oxalis tuberosa* Mol.) from Cajamarca, Peru

ABSTRACT

In order to assess the genetic diversity of cultivated oca from the Cajamarca region, 143 accessions were collected and characterized using morphological descriptors and AFLP molecular markers. Preliminary analyses indicate 137 unique morphotypes within this collection. The percentage of polymorphism obtained in the molecular analysis was 46% with cluster analysis indicating 10.9% duplicated germplasm. These results indicate a high level of morphological and genetic diversity in cultivated oca from the Cajamarca region.

INTRODUCCION

La oca es el tubérculo más cultivado de los Andes después de la papa (Malice, 2009), caracterizándose por su rusticidad, tolerancia a climas adversos y tener poca incidencia de plagas y enfermedades; además se cultiva en terrenos y en altitudes donde otros cultivos alimenticios difícilmente prosperan (National Research Council, 1989). Se conoce que la diversidad fenotípica de las ocas es alta, sin embargo, su diversidad genética ha sido pobremente estudiada y al parecer es baja lo que puede deberse a su reproducción netamente vegetativa, aunque también puede reproducirse por la vía sexual bajo condiciones controladas (Pissard *et al.*, 2007). La clasificación de las variedades de oca se hace de acuerdo a la forma, apariencia externa, color y posterior uso de los tubérculos. Dado que la oca es una especie propagada principalmente de forma vegetativa y cultivada bajo sistemas agrícolas tradicionales ha sido hasta ahora un cultivo pobremente estudiado. En este contexto un mejor entendimiento de la diversidad genética y morfológica que hay en el cultivo de oca es esencial para desarrollar estrategias de conservación apropiadas para esta especie. El estudio de la diversidad morfológica y molecular de la oca contribuirá a un mejor entendimiento de la evolución de este cultivo nos permitirá una mejor diferenciación genética entre las diversas accesiones que se tienen. Por ello, en esta investigación se busca estudiar la variabilidad de las ocas cultivadas en la región Cajamarca para promover su uso y adecuada conservación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material Vegetal: Se utilizaron 143 accesiones de oca cultivadas en el caserío de Carbón Alto ubicado en el departamento de Cajamarca a 3970 msnm.

Caracterización

Para la caracterización morfológica se usaron los descriptores morfológicos de la IPGRI (2001). Por otro lado, para la caracterización molecular, la extracción de ADN se realizó mediante el método de CTAB de acuerdo al método de Doyle & Doyle (1990), utilizando hojas frescas de oca, las cuales fueron sometidas a nitrógeno líquido para su pulverización. Las concentraciones del ADN aislado fueron cuantificados en geles de agarosa 1%, comparando con concentración conocida del marcador de peso molecular (fago λ) y fue diluido a la concentración de 50 ng/ μ l. Luego, el análisis se realizó según la técnica de AFLP siguiendo el protocolo de Vos *et al.* (1995). La amplificación selectiva se realizó en las 6 combinaciones más polimórficas de pares de combinaciones previamente seleccionadas (Figura 1).

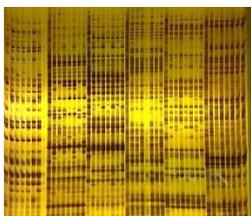


Figura 1: Tamizado de las combinaciones de iniciadores en 8 accesiones de oca cultivadas

Análisis de datos: Los datos registrados de los marcadores morfológicos y moleculares fueron estudiadas empleando análisis de agrupamientos (cluster analysis), utilizando el coeficiente de distancia taxonómica y similitud Simple Matching (SM). Para ello, se siguió el método de agrupamientos UPGMA (unweight pair-group method with arimthmetic means) en el programa estadístico NTSYS 2.2 (Rohlf, 2001).

RESULTADOS Y DISCUSIONES:

Según los descriptores morfológicos para tubérculo (un total de 14 descriptores) se pudo determinar de manera preliminar 137 morfotipos diferentes y 6 posibles duplicados o clones. Los morfotipos encontrados presentan tubérculos con tonalidades que van desde el blanco amarillento hasta el púrpura grisáceo, predominando aquellos de color naranja amarillento (22.8%) y color amarillo (12.4%). En las formas predominan claviformes (55.9%) y ovoides (25.5%). Se aprecia variabilidad en las características evaluadas señalando un alto grado de polimorfismo morfológico para este tipo de variables cuya heredabilidad es alta (Figura 2).

Figura 2. Variabilidad de color de la piel de la oca



En la caracterización molecular, se usaron 6 combinaciones de iniciadores diferentes en 46 individuos, encontrándose un total de 172 marcadores polimorficos, esto significa que el porcentaje de polimorfismo total es de 46.2% para la población analizada. En la tabla 1 se muestra el porcentaje de polimorfismo de cada combinación de iniciadores:

Tabla 1: Combinación de Iniciadores utilizados

Combinaciones de iniciadores	Porcentaje de Polimorfismo
ATG/ACA	36.51
ACA/CTA	49.02
AGC/CAT	44.26
ATG/CTA	45.24
AAC/CTA	60.71
AGC/ACA	43.86

En la figura 3. Se aprecia el dendograma obtenido para las 46 accesiones estudiadas, como parte de los avances de la caracterización molecular. Con un coeficiente de similaridad de 0.9 se determinan 41 genotipos, lo que indicaría solamente 10.9 % de duplicados, es decir una alta variabilidad genética de ocas cultivadas, esto difiere de los resultados de otros autores donde afirman que la variabilidad genética de ocas es baja debido a su propagación netamente vegetativa.

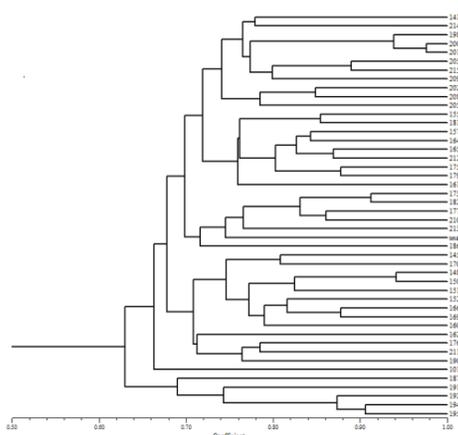


Figura 3: Dendograma de similaridad para 46 accesiones de Oca de Cajamarca

CONCLUSIONES:

La caracterización morfológica de los tubérculos permitió identificar 137 morfotipos, lo que significa alta variabilidad morfológica. Por otro lado, la caracterización molecular permitió diferenciar a un nivel de similaridad de 0.9, 41 genotipos, es decir un 10.9 % de duplicados, lo que indica, de manera preliminar una alta variabilidad genética en las ocas cultivadas de la región Cajamarca.

Agradecimiento: El presente trabajo fue financiado por el proyecto AGROECO, con fondos del Programa Canadiense de Investigación Internacional en Seguridad Alimentaria (CIFSRF).

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Doyle, J.J. and Doyle, J.L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 12:13–15.
2. IPGRI-CIP 2001. Descriptores de Oca (*Oxalis tuberosa* Mol.) Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos, Rome; Centro Internacional de la Papa, Lima.

3. Malice, M. 2009. Genetic Diversity and Structure of Three Andean Tubers: *Oxalis tuberosa* Molina, *Ullucus tuberosus* Caldas and *Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pav. Dissertation originale présentée en vue de l'obtention du grade de docteur en sciences agronomiques et ingénierie biologique. Universitaire Des Sciences Agronomiques de Gembloux. 197 p.
4. Pissard, A.; Ghislain, M.; Bertin, P. 2006. Genetic diversity of the Andean tuber-bearing species, oca (*Oxalis tuberosa* Mol.), investigated by inter-simple sequence repeats. *Genome* 49: 8-16
5. Rohlf, F. 2001. NTSYS-pc. Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, versión 2.01. Exeter Software, Setauket, New York.
6. Vos, P.; Hogers, R.; Bleeker, M.; Reijans, M.; Van De Lee, T.; Hornes, M.; Frijters, A.; Pot, J.; Peleman, J.; Kuiper, M.; Zabeau, M. 1995. AFLP: A new technique for DNA Fingerprinting. *Nucleic Acids Reserch* 23:4407-4414.

Mejoramiento de la asociación con habas en la Variedad de Maíz PMD-638 tolerante al frío, para un sistema de producción más sostenible en la región alto-andina.

Hilario Santos¹, Franco Ventura¹, W. Saona¹, R. Sevilla²

1: Tesistas, 2: Profesor emérito, Facultad de Agronomía Universidad Nacional Agraria La Molina. rsevilla@lamolina.edu.pe

RESUMEN

La asociación del maíz con haba debe hacerse con variedades de maíz precoces y de porte bajo de maíz. Con el objetivo de mejorar la capacidad de asociación del maíz con habas, se probó la eficiencia de selección en tres ciclos de selección en la variedad de maíz PMD-638, adaptada y tolerante al frío: C7, C8, C9, usando el método de selección mazorca-hilera modificada con una intensidad de selección de 20%. Dos repeticiones se sembraron en monocultivo y dos asociadas con una misma variedad adaptada de haba. En el experimento del ciclo C7 fue posible estimar la depresión del rendimiento del maíz en las parcelas asociadas: 35%. El ciclo 8 fue fuertemente afectado por las heladas sobre todo en la época de floración. En 1998 las buenas condiciones ambientales permitieron una selección efectiva mostrando la superioridad de C9 que alcanzó un rendimiento de 10 t/ha con una depresión por asociación de 10%.

ABSTRACTS

The best way to associate faba bean is with short plants maize varieties. In this research it was test the possibility to improve the intercropping capacity of maize adapted to the Andean highlands. Three selection cycles in the maize adapted and cold tolerant variety PMD-638: C7, C8, C9, using the modified ear to row method of selection were evaluated. Two replications were planting as monocropping and two replications as intercropping. Intensity of selection for intercropping capacity was 20%. In each experiment it was included as testers the two previously selected populations. In all experiments the same adapted faba bean variety was used. In the C7 experiment it was possible to estimate the maize yield depression in the intercropping plots: 35%. In C8 maize was seriously affected by freezing, mainly in the flowering time. In 1998, the good weather conditions allow an effective selection. The results shows the superior yield of C9, reaching 10 ton/ha. The intercropping depression in C9 was 10%.

INTRODUCCIÓN

La siembra del maíz amiláceo asociado con habas es una práctica generalizada en la Sierra alto andina del Perú. El uso eficiente de los recursos es mucho mejor en cultivos asociados (Hood y Gascho, 1988). Las experiencias en Perú permiten concluir que la siembra del maíz y el frijol debe ser en la misma época (Cerrate y Camarena, 1975; Tuzet, 1975), y no hay diferencias entre maíz de Sierra asociado vs no asociado con frijol (García, 1977). En general las variedades de maíz más altas y con más follaje sufren menos con la asociación, pero disminuyen el rendimiento de la leguminosa. Se probó la efectividad de la selección en la capacidad de asociación del maíz con haba.

MATERIALES Y MÉTODOS

Todos los experimentos se realizaron en el Instituto Regional de Desarrollo de la Sierra de la Universidad Nacional Agraria La Molina (IRD-Sierra de UNALM), situado en Jauja a 3,300 msnm. La investigación duró tres años, desde la siembra en Octubre de 1995 hasta Mayo de 1998. Tres experimentos correspondieron a la Selección mazorca-hilera modificada (Lonquist, 1964) de la variedad de maíz PMD-638; el de la campaña 1995-1996 correspondió al séptimo ciclo de selección (Santos, 1998), el de la campaña 1996-1997 al octavo ciclo (Saona, 1997) y el de la campaña 1997-1998 correspondió al noveno ciclo de selección (Ventura, 1999). En todos los casos la selección entre familias de maíz fue para rendimiento y por capacidad de asociación con habas, o sea se seleccionaron las familias que acusaron más rendimiento y menos depresión por asociación. La intensidad de selección para familias fue 20%. Dentro de familias se seleccionaron las 5 mejores mazorcas. Los experimentos tuvieron cuatro repeticiones: dos en monocultivo de maíz y dos en asociación con una variedad adaptada a la región. En cada experimento se incluyeron como testigos las poblaciones seleccionadas de los ciclos anteriores: C6 es el macho del experimento cosechado en 1994; C7 es el macho de 1995; C8 es el macho de 1996 y C9 es el promedio de las familias probadas en 1998.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La depresión del rendimiento debido a la asociación con haba se expresará como porcentaje, dividiendo el rendimiento en asociación entre el rendimiento en monocultivo. Estimaciones en C7 permiten inferir que la asociación con haba reduce el rendimiento del maíz en aproximadamente 35%. Las heladas causaron serios daños al maíz en el segundo ciclo de

selección, en la etapa más crítica, la etapa fenológica de floración. El rendimiento de C6, C7 y C8 fue 2,913, 3,540 y 3,479 respectivamente. La depresión por asociación solo se pudo evaluar comparando el promedio de las familias en cultivo asociado (3,147 kg/ha) y en monocultivo (3,560 kg/ha); o sea 88.4 % del rendimiento asociado con relación al monocultivo: 11.6% de depresión por la asociación. El noveno ciclo de selección que se ejecutó durante la campaña 1997-1998 permitió hacer una selección efectiva porque las condiciones ambientales fueron muy buenas alcanzándose rendimientos de más de 10 toneladas por hectárea. El rendimiento promedio de todas las familias fue 9,195 y el promedio de las 43 familias seleccionadas fue 10,858. La comparación entre los ciclos se muestra en el cuadro 1. En el ciclo 7 se obtuvo una productividad promedio de 7,484 kg/ha, en el C8, 8,171 y en el ciclo 9, el rendimiento promedio de los dos sistemas fue 9,195 kg/ha.

Cuadro N° 1 Comparación entre los ciclos C7 y C8 asociados con haba y en monocultivo con el promedio de todas las familias probadas en el ciclo 9. Jauja, 1997-1998.

Ciclo	Asociado con haba (A)	Monocultivo (M)	A/M	Depresión por A
C7	6,177	8,069	77	23
C8	7,131	9,211	77	23
C9	8,734	9,655	90	10

Los resultados muestran una clara superioridad de C9. Hay sin embargo varias dudas que se originan de la falta de ganancia en C8 a pesar de la rigurosa selección en C7. Una posible explicación es que los genes responsables de caracteres adaptativos están generalmente en frecuencias bajas (Sevilla y Holle, 2004), de manera que en los primeros ciclos no se nota la ganancia por selección; a medida que aumenta la frecuencia de los alelos responsables se hace más evidente la ganancia a través de los ciclos (Falconer, 1960).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Cerrate A. y F. Camarena. 1975. Cultivos asociados maíz-frijol en el Callejón de Huaylas, Perú. Informativo de Maíz. N° Ext de Investigación Vol I: 68-72
- García-Rosell G. 1977. Efectos de la fertilización y asociación con frijol sobre el rendimiento y las características morfológicas de 38 variedades de maíz. Tesis Ing Agrónomo. UNA La Molina.
- Hood J.E. y G.J. Gascho, 1988. Multiple cropping for efficient use of water and nitrogen. En: Cropping strategies for efficient use of water and nitrogen. Pags: 7-20. ASA Especial pub. N° 51. Wisconsin, USA.
- Lonnquist J. H. 1964. A modification of the ear to row procedure for the improvement of maize populations. Crop Science 4: 227-228.
- Santos H. 1998. Selección mazorca-hilera modificada en la variedad de maíz PMD-638 en la Sierra Central. Tesis Ing Agrónomo. UNA La Molina. Lima, Perú
- Saona W. 1997. Selección de una variedad de maíz de la Sierra Alta en un sistema asociado Maíz-Habas. Tesis Ing Agrónomo. UNA La Molina. Lima, Perú
- Ventura F. 1999. Selección de la variedad de Maíz PMD-638 asociada con habas en condiciones de Sierra Central. Tesis Ing Agrónomo. UNA La Molina. Lima, Perú
- Tuzet R. 1975. El cultivo asociado y continuado de Maíz-Frijol. Tesis Ing Agrónomo. UNA La Molina. Lima, Perú.

Diversidad de cultivares locales de olluco (*Ullucus tuberosus* C.) de la región de Cusco

Rosaura LAURA, Joel FLORES¹, Daniel HUAMAN¹, Andrew RISEMAN², Eduardo JOVEL² & Raúl BLAS¹

¹Facultad de Agronomía, Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM), Lima, Perú; ²University of British Columbia, Canadá

rosauralaura@gmail.com; rblas@lamolina.edu.pe

RESUMEN

Con la finalidad estudiar la diversidad de cultivares de Olluco de la Región de Cusco, se realizó la caracterización morfológica, evaluaciones preliminares y el análisis molecular con la técnica AFLP en proceso. El análisis preliminar permitió determinar 51 grupos morfológicos, lo que muestra 58% de duplicados; cuyas características principales se pueden englobar en tallos generalmente elongados rastreros (63.3%), con tallos verde claro (34.1%), hojas cordadas (56.5%), de tubérculos amarillo naranja redondeados con pigmentaciones. Por otro lado, los marcadores moleculares permitieron determinar en forma preliminar 75% de duplicados a un coef. de similaridad de 0.81. Estos resultados indican un rango de variación de 17% entre el análisis molecular y morfológico que podría ser efecto del medio ambiente y algo de error humano, aun así a nivel molecular se tendría una mejor definición de los morfotipos.

Diversity of local cultivars of olluco (*Ullucus tuberosus* C.) from Cuzco, Peru

ABSTRACT

In order to study the genetic diversity among 120 olluco (*Ullucus tuberosus* C.) accessions from the region of Cusco, we characterized morphology, agronomic performance, and AFLP molecular markers (in progress). A preliminary analysis indicates the presence of 51 morphological subgroups, whose primary differentiators were creeping stems (63.3%), chordate leaves (56.5%), and yellow tubers with pigmentation. At the molecular level, 30 subgroups were identified with a similarity coefficient of 0.81. These results indicate a range of variation of 17% between the molecular and morphological analyses and could include variation introduced from both the environment and human error. However, further analysis of the molecular data will better define the true genetic variation among the collection.

INTRODUCCIÓN

El Olluco (*Ollucus tuberosus* C.) es el segundo tubérculo mas consumido de la región andina después de la papa cuyo cultivo se ha reducido al uso de menos de 5 cultivares más comerciales. Sin embargo, existe mayor diversidad conservada por familias de agricultores tradicionales fuente de genes de resistencia por su rusticidad, tolerancia a enfermedades, riqueza en carbohidratos, aminoácidos esenciales, alto contenido de vitamina C y efectos profilácticos. El presente trabajo se realiza para identificar morfotipos existentes con el objetivo de conocer la diversidad en estos cultivos, proponer mejores estrategias para el manejo sostenible de la agrobiodiversidad regional y fortalecer la soberanía alimentaria de los pueblos alto-andinos.

MATERIAL Y MÉTODOS:

El material vegetal se estableció en un jardín de diversidad a 3650 en la comunidad de Huancco Pillpinto (Calca-Cusco) de la colecta realizada de 120 accesiones de olluco en 12 provincias de Cusco, la caracterización morfológica fue en base a descriptores consensuados de IPGRI/CIP (2003) en dos etapas: en plena floración e inmediatamente posterior a la cosecha. Paralelamente se realizó evaluaciones preliminares como altura de planta, relación largo/ancho de hoja, longitud de peciolo, número de tallos principales, numero de tubérculos/planta, peso de tubérculos/planta, diámetro medio de tubérculo, largo de tubérculo y numero de ojos/ tubérculo.

La caracterización molecular está en proceso de conducción, utilizando 50ng/ul de DNA de cada individuo según la técnica AFLP (Vos *et al.*, 1995). Se están utilizando combinaciones de iniciadores en base a la revisión literaria con un alto valor de contenido del índice de polimorfismo (PIC): Eco12/Mse3, Eco13/mse32, Eco32/Mse32, Eco45/Mse32, Eco45/Me35, Eco32/Mse35.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Del análisis de conglomerados (Cluster) se determinó 51 grupos morfológicos a un coef. de distancias de 0.4 con una relación cofenética de $r = 0.9223$, estos morfotipos expresan características referidas a su nombre común en Quechua para

algunos casos. El análisis de Correspondencia múltiple muestra que 3 componentes aportan el 85.4% (tabla.1) de información de la variabilidad observada en campo. Las características morfológicas que predominan en la colección fue principalmente de porte de planta intermedio (37.5%) y porte erecto (12.5%) con presencia de tallos generalmente elongados rastreros (63.3%), con tallos de verde claro (34.1) muchas veces con pigmentaciones (39.1%), con hojas cordadas en su mayoría (56.5%), de color de follaje verde amarillento y/o rojo grisáceo, además se encontró moderada floración (más del 50%) y reducida presencia de frutos cuajados. En cuanto a las características del tubérculo predominan tubérculos redondeados con pigmentaciones y tubérculos alargado o redondeados amarillos, además se encontraron tubérculos blancos, púrpuras e intermedios en reducido porcentaje. En cuanto a las evaluaciones preliminares, el promedio de tubérculos fue de 40 tubérculos/planta y el peso promedio fue de 316 gr/planta. Del análisis molecular se determinó 30 subgrupos a un coef. de similaridad de 0.81 (Simple Matching).

Tabla 1: Valores propios de los componentes (dim), aporte (%) y nivel de significancia de cada componente.

dim	value	%	cum%
1	0.581039	48.5	48.5
2	0.276548	23.1	71.6
3	0.165046	13.8	85.4
4	0.053845	4.5	89.9
5	0.031063	2.6	92.5
6	0.019256	1.6	94.1
7	0.017177	1.4	95.6
8	0.012022	1	96.6

Figura 1. Variabilidad del color de la piel y pulpa de los ullucos



CONCLUSIONES PRELIMINARES

El análisis morfológico nos permitió definir 51 grupos morfológicos reconocibles para los agricultores de Cusco, sin embargo el análisis molecular nos está permitiendo reconocer duplicados para tener una mejor definición de los cultivares de ullucos, con ello aportar metodologías de gestión y posible mejora de este cultivo.

Agradecimiento: El presente trabajo fue financiado por el proyecto AGROECO, con fondos del Programa Canadiense de Investigación Internacional en Seguridad Alimentaria (CIFSRF).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Blas Sevillano, R.; Moscoso Cusi, E.; Pérez Hurtado, I.; Quispe Apaza, C.; Quiñones Ccorimanya, E.; Chacón Campana, A.; Bedoya Maíz, B.; Pulido Santiago, H.; Paucar Armas, M.; Tello Villavicencio, M.; Baudoin, J., 2007. Inventario de la Variabilidad Genética de los Tubérculos para la Conservación *in-situ*. Simposio de Recursos Genéticos para América Latina y el Caribe "Por una valoración de los Recursos Genéticos para el Desarrollo Sustentable en América Latina y el Caribe". Universidad Autónoma de Chapingo, Chapingo-Mexico. Pag 140.
- IPGRI/CIP. 2003. Descriptores de ullucus (*Ullucus tuberosus*). Instituto Internacional de Recursos Filogenéticos - Centro Internacional de la Papa, Lima. 42 p.
- Parra-Quijano, M.; S. Panda; N. Rodríguez y Elena Torres. Diversity of *Ullucus tuberosus* (Basellaceae) in the Colombian Andes and notes on ulluco domestication based on morphological and molecular data. Genet Resour Crop Evol (2012) 59:49–66.
- Rousi, A.; P. Jokela; R. Kalliola; L. Pietila y J. Salo, 1989. Morphological variation among clones of ulluco (*Ullucus tuberosus*. Basellaceae) collected in southern Perú. Economic Bot. 43(1): 58-72.
- Vos, P; Hogers, R; Bleeker, M; Reijans, M; Van De Lee, T; Hornes, M; Frijters, A; Pot, J; Peleman, J; Kuiper, M; Zabeau, M. 1995. AFLP: A new technique for DNA Fingerprinting. Nucleic Acids Research 23:4407-4414.

Adaptación de 63 líneas introducidas de fríjol (*Phaseolus vulgaris* L.) a condiciones de la Costa central peruana

Daniela PUMALPA MENESES¹ y Amelia HUARINGA JOAQUÍN²

¹Universidad Nacional Agraria La Molina, Maestría en Mejoramiento Genético de Plantas;
daniela1101@gmail.com;

²Universidad Nacional Agraria La Molina, Programa de Leguminosas de Grano y Oleaginosas;
ahuarina@lamolina.edu.pe

RESUMEN

La adaptación de 63 líneas introducidas de fríjol (*Phaseolus vulgaris* L.) en condiciones de la costa central se determinó en parcelas de observación ubicadas en la Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM), donde se utilizaron 35 descriptores morfológicos del IBPGR (1982) comprendiendo el rendimiento de grano seco y sus respectivos componentes, con lo cual se determinó que las líneas que sobresalieron para el fríjol blanco fue la CIAT 27 y para grano amarillo fue CIAT 62.

ABSTRACT

The adaptation of 63 introduced lines of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) to Peruvian Coast conditions was determinate on observation plots located at the NacionalAgraria La Molina University (UNALM), where was evaluated 35 morphologic descriptors of the IBPGR (1982), the yield and its components, thus the line for white bean was CIAT 27 and CIAT 62 for yellow bean.

INTRODUCCIÓN

El fríjol común se considera una de las leguminosas más importantes por sus características nutricionales y agronómicas. Además es la más cultivada a nivel mundial puesto que participa con el 57% de la oferta mundial en esta clase de menestras (FAO 2014). En el Perú los frijoles tipo canario y blanco son los de mayor consumo y en el 2013 presentaron un incremento en la exportación del 72.3% (ADEX 2013), aunque la producción de fríjol en el país, ha venido aumentando pasando de 62.424 ton en el 2002 a 91.635 ton en el 2012 (FAOSTAT 2014), existen limitantes en la producción como la presencia del virus del mosaico común que se transmite por semilla, polen e insectos; y por lo cual se encuentra mundialmente distribuido (Drijfhout 1978). El Programa de Frijol del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), ha liberado líneas de frijoles blancos y amarillos con resistencia al virus a las cuales se les ha incluido el gen bc-3 en su genoma, algunas de éstas líneas se introdujeron en el 2009 y se han conservado en la Universidad Agraria La Molina, por el Programa de Leguminosas de Grano y Oleaginosas (PLGO), con la finalidad de determinar su adaptación a las condiciones de la Costa de Lima para un programa de mejoramiento.

MATERIALES Y METODOS

Se evaluaron 63 líneas avanzadas de fríjol introducidas desde el CIAT, Colombia, 35 de frijol blanco y 28 de frijol amarillo en parcelas de observación ubicadas en el lote el Guayabo, Universidad Nacional Agraria La Molina. Las parcelas de observación tuvieron una dimensión de 1.2 m² de donde se tomaron 10 plantas al azar para realizar la evaluación, las cuales tienen hábito de crecimiento indeterminado tipo IV y fue necesario colocar tutores para favorecer el crecimiento; en cuanto al manejo agronómico se realizó de acuerdo a las recomendaciones que hace el Programa de Investigación y Proyección Social en Leguminosas de Grano y Oleaginosas para estos experimentos.

En las 63 líneas avanzadas se evaluaron los descriptores morfológicos para fríjol del IBPGR (1982) ahora Biodiversity International Research; 20 variables cualitativas y 13 variables cuantitativas, que se muestran en la tabla 1, los componentes de rendimiento (altura de planta, número de ramas por planta, número de nudos a cosecha, número de racimos florales por planta, número de vainas por planta, número de semillas por vaina y peso de 100 semillas) y el rendimiento de cada una de las líneas. Para el análisis de los descriptores se tuvo en cuenta la frecuencia, la moda y los porcentajes para los caracteres, mientras que para las variables cuantitativas se tuvo en cuenta la media, desviación estándar, y rango, estimados mediante el uso del programa MINITAB ver. 15. También se hizo un análisis de regresión para los componentes de rendimiento y en cuanto al rendimiento se determinó la mejor línea de acuerdo al promedio obtenido.

RESULTADOS Y DISCUSION

De las 63 líneas avanzadas a evaluar solo 55 de ellas germinaron y se desarrollaron, descartándose así las líneas CIAT 7, 11, 23, 29, 31, 37, 53 y 56 para las condiciones de la Costa de Lima. Para las variables cualitativas se tuvo en cuenta la moda, la frecuencia y el porcentaje de los resultados obtenidos; en la siguiente tabla se resume la información.

Para los componentes de rendimiento se obtuvo que la ecuación de regresión resultante para el rendimiento en kilogramos es:

$RTO = - 0.253 - 0.000408 \text{ Altura} + 0.0835 \text{ N. Ramas} - 0.0023 \text{ N. nudos} + 0.0354 \text{ N. vainas/pl.} + 0.0374 \text{ N. sem/v.} + 0.00189 \text{ Peso 100 sem.} + 0.00151 \text{ Racimos/planta}$. Con un coeficiente de determinación $R^2 = 63.4\%$. En cuanto al rendimiento la línea de frijol blanco CIAT 27 obtuvo 1985.81 kg/ha, mientras que con la línea CIAT 62 se obtuvo un rendimiento de 1974.71kg/ha.

En el caso del frijol voluble (Vélez et al. 2007) realizaron un estudio donde alcanzo madurez fisiológica a los 158 días, mientras que en este ensayo de adaptación con las líneas avanzadas introducidas se obtuvo una madurez fisiológica en 136.5 días en promedio, lo que nos da una disminución en el periodo vegetativo de 21 días, el comportamiento precoz o tardío de los genotipos es producto del efecto génico de cada material (Enríquez, 1977)

Los caracteres cualitativos son más confiables que los cuantitativos para describir variedades de frijol, estos usualmente tienen una distribución discreta, generalmente están determinados por pocos genes y las modificaciones que experimentan por el medio ambiente son pocas (CIAT, 1983). En cuanto a las variables cuantitativas de importancia está el tamaño de la vaina de 115 de longitud y 1.17 cm de ancho, mayor al encontrado por Vallejos y Martínez (2005) correspondiente a 9 cm de largo y 9 mm de ancho, en cuanto a la altura promedio se obtuvo 130 cm, sin embargo las diferencias de altura en cada uno de los genotipos es debido posiblemente a que la longitud de un entrenudo a otro varía, debido a las acciones génicas y ambientales que determinan el carácter (Davis, 1985). El carácter semillas por vaina en una planta es uno de los factores determinantes del rendimiento (Masaya, 1987), para este estudio se obtuvo un total de 4 lóculos por vaina y 19 vainas por planta. Consecuentemente, el peso de 100 semillas, otro componente de rendimiento es condicionado por el traslado de los nutrientes de la planta a la semilla durante la fase vegetativa de la planta (Bidwell, 1979), Singh (1985) señalo que el peso de 100 semillas es un carácter determinado por el tamaño de los granos, que a su vez determinado con largo, grueso y alto del mismo que correspondió a 1.37 cm, 0.84 cm y 0.65 cm en promedio respectivamente, además de la densidad. En este estudio se obtuvo un peso de 100 semillas promedio de 55.8 gramos. Además de un rendimiento de grano seco medio de 1288 kg/Ha; el rendimiento es un carácter cuantitativo y controlado por varios o muchos genes (Davis, 1985) y se encuentra en función de varias características anatómicas y morfológicas, que tienen que ver con el número de vainas por rama, el número de vainas por planta, número de semillas por vaina y el peso de la semilla (Márquez, 1991). Esto permitió determinar la mejor línea para frijol blanco fue la CIAT 27 y para grano amarillo fue CIAT 62.

Tabla 1: Variables cuantitativas evaluadas con su correspondiente prueba estadística

VARIABLES CUANTITATIVAS						
Variable	Media	Desv.Est.	CV (%)	Mín.	Máx.	Rango
DMF	136.34	6.09	4.50	126	153	27
Diámetro	0.43	0.08	19.10	0.27	0.64	0.37
N lóculos	4	0.76	18.60	2	6	4
Long. vaina	11.50	2.04	17.80	7.2	21.0	13.8
Anc. vaina	1.20	0.18	15.30	0.85	1.80	0.95
Long. Grano	1.40	0.14	10.40	1.07	1.70	0.63
Ancho grano	0.80	0.08	9.30	0.65	1.00	0.35
Alto grano	0.65	0.07	10.80	0.50	0.83	0.33
Ancho hoja	6.80	1.27	18.80	3.90	11.0	7.10
Long. Hoja	9.50	1.56	16.30	5.40	13.8	8.40
Long. Botón	0.80	0.27	33.90	0.40	2.40	2.00
Anc. Botón	0.40	0.11	26.10	0.20	0.70	0.50
Long inf	7.20	4.57	63.10	1.30	20.4	19.1
Long pedic	0.70	0.36	50.00	0.23	1.90	1.67
Long. Brac	0.60	0.23	40.60	0.10	1.40	1.30
Anc. Brac	0.40	0.16	44.20	0.20	0.90	0.70
Long pico	1.50	0.63	43.40	0.00	3.20	3.20

* DMF: Días a Madurez Fisiológica Long.: Longitud Anc: ancho Bot: Botones Inf: Inflorescencias Bract: bractéolas Pedic: pedicelo

Tabla 2: Variables cualitativas evaluadas con su correspondiente prueba estadística

Variable	VARIABLES CUALITATIVAS			
	Característica predominante	Frec.	Moda	Porc. %
Forma de hoja	Triangular	33	1	60
Color clorofila	Verde oscuro a verde pálido	20	3,7	36.4
Antocianina	Presencia	29	1	52.7
Color alas	Blanco	53	1	96.4
Forma bractéola	Ovalada	30	7	54.5
Posición de vainas	Base	28	1	51
Posición del pico	Marginal	46	1	83.6
Orientación del pico	Hacia abajo	27	7	49
Color vaina	Amarillo oro u oscuro	24	10	43.6
Curvatura	Erguido	31	5	56.4
Color hiliun	Blanco	31	1	56.4
Color grano	Blanquizco	27	8	49
Brillo grano	Mate	27	5	49
Forma grano	Ovalado	33	2	60
Persistencia	Intermedia	20	5	36.4
Color estandarte	Blanco	39	1	71
Sutura	Sin hilachas	25	0	45.5
Fibra	Corácea	35	5	63.6
Carga	Intermedia	17	5	31
Vigor	Intermedia	17	5	31

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical) CO. 1987. Sistema Estándar para la Evaluación de Germoplasma de Fríjol.
- Drijfhout, E.1978. Genetic interaction between *Phaseolus vulgaris* and been common mosaic virus with implications for strain identification and breeding for resistance.
- FAOSTAT. 2014. Estadísticas sobre producción, área cosechada, rendimiento y áreas de siembra en Perú.
- IBPGR (International Board for Plant Genetic Resources).1982. Descriptors for *Phaseolus vulgaris*.
- Vélez, L; Clavijo, J y Ligarreto, G. 2007. Análisis Ecofisiológico del Cultivo Asociado a Maíz (*Zea mays* L.) – Fríjol voluble (*Phaseolus vulgaris* L).
- Vallejo, B; Martínez, L. 2005. Caracterización y evaluación de 7 genotipo de frijol común grano color rojo (*Phaseolus vulgaris* L) en la Estación Experimental La Compañía, Carzo. 2004-2005.

Comportamiento de híbridos dobles con líneas CIMMYT de maíz amarillo duro *Zea mays* L. en Oxapampa, Pasco, Perú.

¹Javier J. Gonzales-Arteaga; ²Julián Chura-Chuquija; ²Gilberto García-Pando; ³Juan Rodríguez-Layza; ¹María D. Ojeda-Mantari; ¹Mercedes C. Ordoñez-Salcedo

¹E.F.P. Agronomía sede Oxapampa, Universidad Nacional Daniel Alcides Carrión (UNDAC), Pasco, Perú. ²Programa de Investigación y Proyección Social en Maíz, Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM), Lima, Perú. ³E.F.P. Zootecnia sede Oxapampa, Universidad Nacional Daniel Alcides Carrión (UNDAC), Pasco, Perú.

¹jjgonzalesacad@gmail.com,

²jchura2004@yahoo.es, ²nagarciapando@gmail.com, ³rodriguezlayza@gmail.com, ¹mariaojedamantari@yahoo.es

RESUMEN

Con el objetivo de evaluar el comportamiento de híbridos dobles con líneas CIMMYT y 04 híbridos comerciales de maíz amarillo duro *Zea mays* L., en Miraflores, distrito y provincia de Oxapampa, se instalaron en un diseño experimental Látese triple 6x6 y 3 repeticiones; cada unidad experimental estuvo constituida por dos surcos con distanciamiento 0,80 m, 16 golpes en cada surco, 0,40 m entre golpes y dos plantas por golpe. Los resultados mostraron que, ocho híbridos experimentales y dos comerciales fueron superiores en rendimiento entre 8,74 y 10,44 kg ha⁻¹; el híbrido experimental 589*575 fue más precoz con 92,30 y 94,03 días en floración masculina y femenina, respectivamente, ocupando el sexto lugar en rendimiento con 9,13 t ha⁻¹; y, de mayor rendimiento fue el híbrido comercial DK-5005 con 10,44 t ha⁻¹, además superior en hileras por mazorca (16,87) y granos hil⁻¹ (38,14).

ABSTRACT.

In order to evaluate the performance of double hybrids with CIMMYT lines and 04 commercial hybrids of yellow corn *Zea mays* L., in Miraflores, district and province of Oxapampa, settle donan triple lattice experimental design 6x6 and 3 replications; each experimental unit consisted of two rows with spacing of 0,80 m, 16 strokes in each furrow, 0,40 m between hits and two plants per hole. There sults showed that eight experimental and two commercial hybrids were superior in yield between 8,74 and 10,44 t ha⁻¹; the experimental hybrid 589 * 575 was earlier with 92,30 and 94,03 days for male and female flowering, respectively, ranking sixth in yield with 9,13 t ha⁻¹; and, the highest performing was DK-5005commercial hybrid with 10,44 t ha⁻¹, also higher in rows per ear (16,87) and kernels row⁻¹ (38,14).

INTRODUCCION

El maíz *Zea mays*L. es uno de los cultivos de mayor importancia a nivel mundial, debido que tiene un amplio rango de adaptación y un alto valor nutritivo. En el Perú, en costa y selva, la producción anual de maíz amarillo duro no es suficiente para satisfacer la demanda interna. En Oxapampa, el rendimiento es de 2,00 t ha⁻¹, principalmente porque no se utiliza semilla mejorada, una de las formas de incrementar la producción, es elevando los rendimientos por unidad de área. Esto se puede conseguir haciendo investigaciones en mejoramiento genético para lograr híbridos de alto rendimiento e incentivando a los agricultores utilizar estos híbridos para su beneficio y de la producción nacional.La investigación tuvo como objetivo evaluar el comportamiento de híbridos dobles con germoplasma CIMMYT bajo las condiciones de Oxapampa.

MATERIAL Y METODOS

El trabajo se ejecutó en el fundo Schutze barrio Miraflores, distrito y provincia de Oxapampa, Región Pasco; a 1 834 m.s.n.m, entre 10°35'25" L.S., 75°23'55" L.O. del meridiano de Greenwich. La fase experimental tuvo una duración de seis meses, desde julio 2006 enero 2007. El análisis de suelo, indica con un pH de 5,4, 1,05 % de materia orgánica, disponibilidad de fósforo y potasio con 11,33 y 11,4 ppm respectivamente, textura franco arenoso con buena capacidad retentiva de humedad y aireación. El clima, húmedo semicálido, precipitación promedio de 1 800 mm; humedad relativa de 78,8 y temperatura promedio 17,5 °C. El material genético estuvo constituido por 32 híbridos dobles formados con líneas provenientes del CIMMYT y 04 híbridos comerciales como testigos, fueron conducidos en el diseño experimental de Látese triple 6 x 6 y 3 repeticiones. La parcela constituida de dos surcos con distanciamiento 0,80 m entre ellos, 16

golpes con 0,40 m entre cada golpe y con dos plantas por golpe. Los datos fueron procesados con hoja de cálculo Excel, determinando el análisis de varianza y Diferencia Límite Significativa, $\alpha = 0,05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis de varianza de las características pre y post cosecha encontró diferencias altamente significativas; de los 36 híbridos evaluados, en la tabla 1 se observa que, ocho híbridos experimentales y dos híbridos comerciales fueron superiores en rendimiento de grano, entre los cuales el híbrido experimental 743*737 con 8,74 t ha⁻¹, en floración masculina (93,07 días), altura de planta (193,38 cm) y en granos/hilera (36,38), y el híbrido comercial DK-5005 con 10,44 t ha⁻¹, en hileras por mazorca (16,87) y en granos por hilera (38,14); Sinche *et al.* (2 010) mencionan, a nueve híbridos dobles promisorios y cuatro híbridos comerciales superiores en rendimiento con valores entre 8,65 y 11,93 t ha⁻¹, entre los cuales estuvieron el híbrido comercial DK-5005 con 10,47 t ha⁻¹, en granos por hilera (36,09) y floración masculina (100,5 días), y el híbrido PMX-12 con 8,97 t ha⁻¹ y 35,90 granos hil⁻¹, esto demuestra que estos dos últimos híbridos poseen la combinación génica para lograr la expresión similar en rendimiento bajo las condiciones de Oxapampa y la superioridad en las otras variables mencionadas es debido a la constitución genética que tiene cada híbrido evaluado y las características del ambiente en donde crecen y se desarrollan Bartolini (1 990).

Por otro lado, el híbrido 589*575 fue superior en rendimiento con 9,13 t ha⁻¹ y en precocidad con 92,30 y 94,03 días a floración masculina (F.M.) y femenina (F.F.), respectivamente; sin embargo, el híbrido 590*575 con 9,22 t ha⁻¹ sólo fue superior en F.M. con 93,33 días y también en D.M. con 5,18 cm. Gonzales et al (2 010) en los distritos de Huancabamba y Oxapampa (provincia de Oxapampa) encontraron que, el híbrido experimental (Exp PM-2) fue el más precoz para ambos lugares con 92 y 93 días, respectivamente, y el híbrido comercial PM-212 fue el más tardío con 97 y 103 días. Asimismo Sinche (2 009) encontró que, los híbridos comerciales referenciales DK – 5005, AG – 001 y XB – 8010 fueron los más precoces en floración femenina, con valores entre 102,00 a 102,25 días, demostrando ser superiores estadísticamente a los híbridos experimentales, y el híbrido comercial referencial PM-212 fue el más tardío con 109,00 días, por tanto, se podría decir que la variación de días a floración femenina de los diferentes híbridos precoces evaluados, depende de su constitución genética, por haberse desarrollado a similares condiciones de Oxapampa.

Tabla 1. Híbridos estadísticamente superiores en rendimiento de grano y en las variables evaluadas. DLS (0,05)

Variables	HÍBRIDOS									
	HÍBRIDO EXPERIMENTAL								HÍBRIDO COMERCIAL	
	736*730	697*691	590*575	589*575	PMX-12	726*723	580*575	743*737	DK-5005	AG-001
F.M. (días)	95,01	96,63	93,33	92,3	96,65	93,48	95,43	93,07	94,63	94,11
F.F. (días)	96,53	98,7	94,71	94,03	100,27	95,45	98,02	96,78	95,81	96,19
A.P. (cm)	211,74	224,71	223,76	216,93	230,06	220,92	241,74	193,38	231,87	227,18
A.M. (cm)	121,55	126,57	120,08	105,38	116,35	112,86	128,2	120,32	117,49	126,14
D.T. (cm)	2,62	2,66	2,74	2,75	2,68	2,65	2,81	2,7	2,74	2,63
L.M. (cm)	16,13	15,66	16,41	16,46	17,98	16,31	17,37	16,46	16,65	15,98
D.M. (cm)	4,76	4,17	5,18	4,86	4,75	4,81	4,8	4,56	4,89	4,58
Hil./Maz.	14,33	13,11	14,57	14,27	13,86	12,54	13,9	13,19	16,87	13,73
Gran.Hil ⁻¹ .	36,06	34,63	34,79	34,66	35,9	35,04	34,76	36,38	38,14	36,26
Rdto en grano (t ha ⁻¹)	10,01	9,28	9,22	9,13	8,97	8,77	8,77	8,74	10,44	9,47
O.M. en Rdto.	2	4	5	6	7	8	9	10	1	3

Los valores en negrita son estadísticamente superiores.

F.M. Floración masculina; F.F. Floración femenina; A.P. Altura de planta; A.M. Altura de mazorca; D.T. Diámetro de tallo; L.M. Longitud de mazorca; D.M. Diámetro de mazorca; O.M. Orden de mérito.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bartolini, G. 1990. El maíz. Mundi Prensa, Madrid.

Gonzales A. J., Rodriguez L.J., Párraga Q. A., Romero R. C., Huamán G. H., Chura Ch. J., Nakahodo N. J., García P. G., Aquino U. y Bottger E. 2010. Comportamiento de híbridos de maíz (*Zea mays* L.) amarillo duro en Oxapampa. Rev. Praxis 2(6): 93-100.

Sinche M. 2009. Evaluación de Híbridos Dobles Experimentales Promisorios de Maíz Amarillo Duro (*Zea mays* L)- en Oxapampa. Tesis Para Optar el Título de Ingeniero Agrónomo. UNDAC. Oxapampa, Pasco – Perú

Sinche M., Gonzales J., Chura J., Nakahodo J., García G. y Gálvez P. 2010. Evaluación de híbridos dobles experimentales promisorios de maíz amarillo duro (*Zea mays* L.) en Oxapampa, Pasco, Perú. Resúmenes del Primer Congreso Peruano de Mejoramiento Genético y Biotecnología agrícola. La Molina, Lima Perú.

Comportamiento agronómico de tres genotipos de camote (*Ipomoea batatas* Lam.) con la aplicación de dos inductores de resistencia sistémica adquirida

Sergio Contreras Liza^{1,2}

Edison Palomares Anselmo²

Delia Cajaleón Asencios²

Hebert Huaman Sáenz³

Oscar Ciprian Torres³

1 Autor Corresponsal. scontreras@unifsc.edu.pe

2 Universidad Nacional José Faustino Sánchez Carrion. Av. Mercedes Indacochea 609, Huacho-Perú.

RESUMEN

El presente trabajo de investigación sobre el uso de inductores químicos de resistencia sistémica adquirida en el cultivo de camote, se desarrolló durante las campañas 2012-2013 en el valle de Cañete-Perú. El objetivo fue determinar la efectividad de algunos productos para la inducción de resistencia sistémica adquirida en el comportamiento agronómico de camote con la finalidad de mejorar la sanidad general en los campos de cultivo, incrementar las autodefensas y reducir el impacto de las aplicaciones de agroquímicos. Se sembraron 3 genotipos de camote en un DBCA con 3 repeticiones durante dos campañas, una en invierno del 2012 y la segunda en el verano del 2013. Adicionalmente se aplicaron 2 inductores químicos de resistencia sistémica, fosfito de potasio ($2,5 \text{ mL L}^{-1}$) y ácido acetil-salicílico (100 mg L^{-1}) más un testigo control sin aplicación. Los resultados indican que no existieron diferencias estadísticas ($p > 0,05$) entre los tratamientos inductores y el testigo sin aplicación, para peso de raíces por planta y peso de follaje por planta pero sí existieron diferencias estadísticas entre épocas de siembra y en la interacción de años y genotipos para ambos caracteres, sugiriéndose un efecto fisiológico por la aplicación de ácido acetil salicílico sobre el comportamiento agronómico del cultivo de camote. Se concluye que existió efecto específico del ácido acetil-salicílico y éste incrementó el peso de follaje en los 3 genotipos de camote.

Palabras clave: ácido acetil-salicílico, análisis de variancia combinado, camote, comportamiento agronómico, fosfito de potasio.

ABSTRACT

The present research on the use of chemical inducers of systemic acquired resistance (SAR) in the sweetpotatoes was developed during 2012-2013 in the valley of Cañete, Peru. The objective was to determine the effectiveness of some chemical products used for the induction of systemic acquired resistance on sweetpotato agronomic performance, in order to improve the overall health in the fields, increase plant immunity, and reduce the impact of agrochemical usage. Three sweetpotato genotypes were sown in RCBD with 3 replications during two campaigns, one in the winter of 2012 and the second one, in the summer of 2013. Additionally, two chemical inducers of SAR, potassium phosphite ($2,5 \text{ mL L}^{-1}$) and acetylsalicylic acid (100 mg L^{-1}) were applied as well as an untreated control plot. The results indicated that there were no statistical differences ($p < 0,05$) for root weight/plant and weight of foliage/plant for chemical treatments, but statistical differences were found between seasons and interaction of seasons and genotypes for both traits. This suggests a physiological effect by the application of acetyl-salicylic acid on the agronomic performance of sweet potato. It was concluded that the specific effect of acetylsalicylic acid increased the weight of foliage/plant in 3 genotypes of sweet potato.

Key Words: Agronomic performance, ANOVA, acetyl-salicylic acid, potassium phosphite, sweet potatoes.

INTRODUCCION

El ácido salicílico es considerado un candidato para aplicaciones exógenas como activador de resistencia y la aspirina en particular, ha sido seleccionada como un producto de bajo costo y no fitotóxico (Delany *et al.*, 1994). Provocada normalmente por una infección local, las plantas responden con una cascada de señalizaciones dependientes del ácido salicílico que conducen a la expresión sistémica de resistencia de amplio espectro y a una resistencia duradera que es eficaz contra hongos, bacterias e infecciones virales. En palabras de Walters (2009), la resistencia inducida tiene potencial de revolucionar el control de enfermedades en los cultivos, pero sigue siendo un tipo de protección de cultivos no convencional.

En camote el área dedicada es del orden de 16 800 hectáreas, de las que la región Lima ocupa más del 60% del total sembrado (OEEE, 2013). Es necesario articular estrategias integrales que sean posibles de adoptar por los pequeños

agricultores que producen raíces y tubérculos; una de ellas es la identificación de formas alternativas de manejo de la sanidad de los cultivos que estén al alcance del sector de agricultores de escasos recursos. Con la investigación se busca mostrar la eficacia de productos de bajo costo y de escaso impacto ambiental para la salud humana y para el ecosistema, como son el ácido acetyl salicílico y fosfito de potasio y su efecto en los genotipos evaluados, para mejorar el comportamiento agronómico en los campos de cultivo de camote, así como determinar las posibilidades de usarlos en un plan de manejo integrado de la sanidad.

MATERIAL Y METODOS

Se instalaron 2 experimentos factoriales independientes en camote bajo DBCA con 3 repeticiones en la localidad de Imperial (Cañete) en Invierno-2012 y verano-2013 para evaluar el efecto de 2 inductores químicos de resistencia sistémica reportados en la bibliografía: ácido acetyl salicílico (Delaney *et al.*, 1994;Reymond y Farmer, 1998) y fosfito de potasio (Rickard, 2000), más un testigo sin aplicación, sobre el comportamiento agronómico en 3 genotipos de camote (INA100-INIA, C-10, C-50), siendo el cultivar INA100-INIA el tratamiento testigo. El análisis del suelo en el lugar experimental mostró una clase textural suelo franco, reacción ligeramente alcalina (pH=7,9) y ausencia de sales solubles. La temperatura ambiental media en invierno fue de 18°C y en verano de 26°C. Las aplicaciones de ambos productos se realizaron, cada 2 semanas para el ácido acetyl salicílico (100 mg L⁻¹) y fueron mensuales para fosfito de potasio (2,5 g L⁻¹).

En ambos experimentos se realizó un control experimental de los factores de producción, y se aplicaron los tratamientos al azar en unidades experimentales de 40 plantas en el campo; el diseño experimental fue el de Bloques Completos al azar con 3 repeticiones por tratamiento (genotipo x inductor). Las variables en estudio fueron peso de raíces por planta y peso de follaje por planta. Los datos se procesaron mediante el programa Infostat (Universidad de Córdoba, Argentina) y se usaron las pruebas paramétricas de F (Fisher) para el análisis de la variancia y DLS (p<0,05).

RESULTADOS Y DISCUSION

Los resultados del efecto de inductores químicos en el cultivo de camote se pueden observar en la tabla 1 en la cual el componente de épocas, resultó estadísticamente significativo (p<0,05) y las demás fuentes de variación y sus interacciones, resultaron no significativas en ambas estaciones. Ello sugiere que en cuanto a los inductores utilizados (ácido acetyl-salicílico y fosfito de potasio), éstos no parecen afectar el rendimiento por planta de camote, siendo más importante el aporte de los factores ambientales como las épocas de siembra.

Tabla 1: Análisis de la Variancia Factorial para efecto de tratamientos químicos en 3 genotipos de camote y dos épocas de siembra.

Fuentes de Variación	GLibertad	Peso de follaje/planta C.Medios	Peso de Raíces/planta C.Medios
Épocas	1	3,3004**	3,8134*
Repeticiones/Épocas	2	0,1210	0,1030
Genotipos	2	0,0219	0,3994
Tratamientos	2	0,0448	0,1629
Épocas*Genotipo	2	0,8226**	0,1688
Épocas*Tratamientos	2	0,0034	0,0583
Genotipo*Tratamientos	4	0,0504	0,0672
Épocas*Genotipo*Tratamientos	4	0,0063	0,0808
Error Conjunto	34	0,0797	0,1302

Significación estadística al nivel * p<0,05, ** p<0,01.

Lo mismo se puede apreciar en la figura 1, en la cual las diferencias estadísticas entre los tratamientos inductores no son significativas. Para peso de raíces tuberosas de camote por planta en los genotipos de camote evaluados, los tratamientos inductores evaluados no tuvieron un efecto estadístico.

En lo referente a peso de follaje por planta, se hallaron diferencias estadísticas al nivel de confianza del 95% para años y para la interacción de genotipos por épocas, lo cual implica que estos componentes tienen relevancia para el peso de follaje. En la prueba estadística entre inductores de resistencia versus testigo, se hallaron diferencias estadísticas para el peso de follaje/planta, como se puede apreciar en la figura 2.

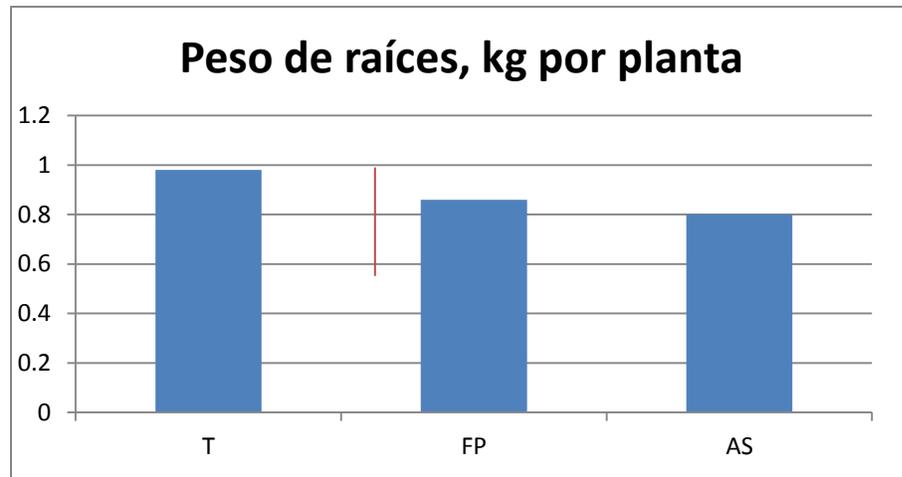


Figura 1: Efecto de ácido acetil salicílico (AS) y fosfito de potasio (FP) sobre el peso raíces/planta (kg) en 3 genotipos de camote y 2 épocas de siembra.

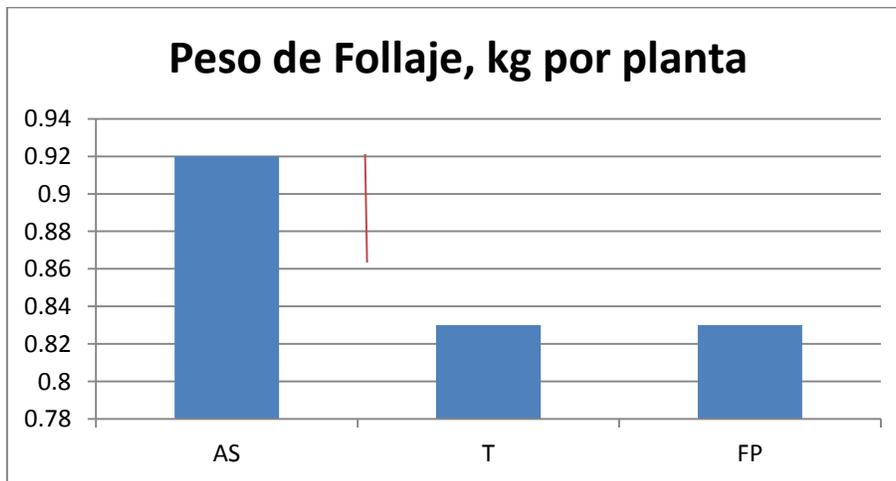


Figura 2: Efecto de ácido acetil salicílico (AS) y fosfito de potasio (FP) sobre el peso de follaje por planta(kg) en 3 genotipos de camote, durante 2 épocas de siembra.

Los resultados de numerosas investigaciones realizadas durante las dos últimas décadas han demostrado que el ácido salicílico juega un papel importante en varios aspectos de las respuestas de defensa posteriores al ataque de un patógeno (Dempsey *et al.*, 1999). Resulta interesante, por lo tanto, seguir explorando las vías de señalización de esta molécula en el contexto de la resistencia a enfermedades en los cultivos (Van Loon, 2008). Asimismo, es necesario evaluar el efecto de dosis de AS ya que como toda fitohormona (requiere una especificidad para su acción en la inducción de defensas en las plantas (Walters, 2009). En la presente investigación se halló que el ácido acetil salicílico incrementó el peso del follaje en el camote bajo condiciones de campo, lo cual concuerda en parte con lo hallado por Zhang *et al.* (2013) quienes demostraron que el ácido salicílico está relacionado con la longevidad del follaje en las plantas y el retraso de la

senescencia en *Arabidopsis*, lo cual podría explicar el efecto de dicha hormona sobre el peso fresco del follaje del camote obtenido en esta investigación.

AGRADECIMIENTOS

Especial agradecimiento a la Facultad de Ingeniería Agraria, Industrias Alimentarias y Ambiental, a la Sede Académica de Lunahuaná (Cañete), así como al Vicerrectorado de Investigación de la Universidad Nacional José Faustino Sánchez Carrión (Huacho), por las facilidades brindadas al proyecto. Especial agradecimiento al Dr. Rodomiro Ortiz de la SLU (Suecia) por las sugerencias hechas al artículo.

LITERATURA CITADA.

Dempsey, D.A., Shah, J. and Klessig, D.F. (1999). Salicylic acid and disease resistance in plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* 18:547-575.

Hayat, S & Ahmad, A. (2007). *Salicylic Acid: A Plant Hormone*. Eds. Springer. The Netherlands.

Eguren, F. 2012. Eficiencia y rendimientos en la agricultura peruana. *La revista Agraria* No. 141: 11-13.

Delaney TP, Uknes S, Vernooij B, Friedrich L, Weymann K, Negrotto D, Gaffney T, Gut-Rella M, Kessmann H, Ward E. (1994). A central role of salicylic acid in plant disease resistance. *Science* 266: 1247-1250.

Oficina de Estudios Económicos y Estadísticos (2013). *Dinámica agropecuaria 2003-2012*. Ministerio de Agricultura y Riego. Lima. 193 p.

Walters, D.R. (2009). Induced resistance: destined to remain on the sidelines of crop protection?. *Phytoparasitica* October 2009. DOI 10.1007/s12600-009-0067-y.

Reymond, P ; Farmer, E. (1998). Jasmonate and salicylate as global signals for defense gene expression. *Current Opinion in Plant Biology* .1998, 1:404-411.

Rickard, D. A. 2000. Review of phosphorus acid and its salts as fertilizer materials. *J. Plant Nutr.* 23: 161-180.

Van Loon, L.C. (2008). Manipulating the Plant's Innate Immune System by Inducing Resistance. *Phytoparasitica* 36:2, 2008.

Zhang K, Halitschke R, Yina C, Liub C, Gan S S. (2013). Salicylic acid 3-hydroxylase regulates *Arabidopsis* leaf longevity by mediating salicylic acid catabolism. *PNAS* 110 (36):1-6. September, 2013.

Mayo 2014

Protección cruzada contra el Virus de la mancha anular del papayo (PRSV) en el cultivo de papaya (*Carica papaya* L.)

J. TENORIO¹, A. CABRERA¹, C. DE LA TORRE¹, J. MARÍN¹, C. AGUILAR¹, C. MALPARTIDA¹, J. KREUZE¹, L.F. SALAZAR²

¹Centro Internacional de la Papa (CIP), Email: j.tenorio@cgiar.org

²International Consultant in Plant Virology, Plant Health Systems and Greenhouse operations, Email: lusalazar43@gmail.com

RESUMEN

La principal limitante del cultivo de papaya es la enfermedad causada por el virus de la mancha anillada del papayo (PRSV). Experimentos de protección cruzada en condiciones de invernadero y campo fueron realizados a partir de dos aislamientos suaves los cuales fueron “purificados” mediante tratamientos consecutivos de temperatura, dilución y envejecimiento “in vitro”. Para la obtención de los aislamientos suaves, muestras de plantas de campo aparentemente sanas (sin síntomas) pero positivas a PRSV (detectadas por NCM-ELISA) fueron colectadas después de inspeccionar de 21 localidades de las provincias de Chanchamayo y Satipo de la región Junín.

Para la selección final de los aislamientos suaves, se inocularon mecánicamente plantas sanas con savia de los aislamientos purificados y se evaluó la segregación, se seleccionaron aquellos aislamientos que no produjeron síntomas o solo produjeron síntomas muy suaves en 100% de las plantas.

En invernadero las plantas pre inoculadas mecánicamente con aislamientos “suaves” y posteriormente con uno o más aislamientos severos no mostraron síntomas de la enfermedad. En condiciones de campo, plantas inoculadas con aislamientos suaves en invernadero fueron expuestas a condiciones de campo y se evaluó su comportamiento y producción (número de frutos por planta y peso de fruto). Las plantas pre inoculadas con variantes suaves no mostraron síntomas y sus rendimientos fueron superiores significativamente al de las plantas testigos (no pre inoculadas con variantes suaves sino con agua destilada). La metodología usada permitió confirmar el valor de la protección cruzada en invernadero y campo para el virus PRSV en el cultivo de papaya.

ABSTRACT

The main limiting the cultivation of papaya is the disease caused by the virus (PRSV) papaya ring spot. Experiments of cross protection in greenhouse and field conditions were made from two mild isolates which were "purified" by means of consecutive treatments of temperature, dilution and aging "in vitro". To obtain the mild isolates, field samples of apparently healthy (without symptoms) but positive to PRSV (detected by NCM-ELISA) were collected after inspecting 21 locations in the provinces of Chanchamayo and Satipo in the region Junín. For the final selection of the mild isolation, healthy plants were mechanically inoculated with purified isolates sap and assessed the segregation; those isolates that produced no symptoms or only produced mild symptoms in 100% of the plants were selected. In greenhouse plants pre mechanically inoculated with mild isolates and subsequently with one or more severe isolates showed no symptoms of the disease. Under field conditions, inoculated with mild isolates in greenhouse plants were exposed to field conditions and evaluated their behavior and production (number of fruits per plant and fruit weight). Pre plants inoculated with mild variants showed no symptoms and their yields were significantly superior to the plant witnesses (not inoculated pre with soft variants but with distilled water). The used methodology allowed to confirm the value of the cross-protection in greenhouse and field for the PRSV virus on papaya cultivation.

INTRODUCCIÓN

Papaya (*Carica papaya*) es un importante cultivo de “caja chica” en la selva peruana, tradicionalmente plantada por pequeños agricultores. La enfermedad causada por PRSV, afecta aproximadamente el 90% de las áreas de producción de papaya en el Perú. Los agricultores como una común práctica invaden nuevas áreas del bosque amazónico escapando de la enfermedad, un proceso que causa deforestación de la selva. Cuando la enfermedad llega a estas nuevas áreas los agricultores continúan moviéndose a selva virgen, un ciclo de nunca acabar.

No es posible generar variedades resistentes, ya que no existen fuentes de resistencia en papaya para PRSV.

Una alternativa que se utiliza en otros países es la generación de material transgénico.

Se propone el desarrollo de variantes suaves del virus para contrarrestar la enfermedad (protección cruzada).

MATERIALES Y MÉTODOS

El primer paso fue producir un antisuero para PRSV a partir de una variante severa de PRSV peruana y estandarizar la técnica serológica de NCM-ELISA para el diagnóstico específico del virus (técnica sencilla y barata). Con la técnica disponible se empezaron las prospecciones en la Selva Central para identificar y seleccionar aislamientos suaves de PRSV, plantas sin síntomas pero positivas a PRSV, se hicieron evaluaciones en 8 distritos de las provincias de Satipo y Chanchamayo en la región Junín. .

Los aislamientos suaves recolectados en campo, fueron mantenidos en plantas de papaya en invernadero, para luego pasar por un proceso de “repurificación” por medio de tratamientos de temperatura, dilución y tiempo.

Para la selección del aislamiento tipo (aislamiento suave) se inoculó mecánicamente plantas sanas de papayo con jugo de muestras de hojas de plantas del aislamiento repurificado y se mantuvo en observación por 45 días. Los aislamientos tipo (aislamientos suaves) obtenidos después de la “repurificación” fueron evaluadas para protección cruzada en condiciones de invernadero y campo. Para la evaluación de protección cruzada en invernadero plantas sanas de papaya fueron inoculadas con un aislamiento suave y posteriormente con uno o varios aislamientos severos. Para la experimentación en campo, plantas sanas de papaya fueron inoculadas en invernadero con el aislamiento tipo y después sembradas en campo, como la zona es endémica para PRSV, estas se infectarían fácilmente con aislamientos severos de la zona, cada experimentación tenía sus controles negativos y positivos respectivos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La técnica de NCM-ELISA estandarizada a partir de antisuero producido con variantes peruanas, tiene una eficiencia del 100% en la detección de PRSV. La flexibilidad de la técnica fue muy útil para el proyecto, dado que esta técnica permite ir llenando la membrana a medida que se van colectando las muestras y procesarla en el momento que se desee (pueden pasar muchas semanas antes de procesar la membrana con las muestras) y no es necesario un laboratorio sofisticado ya que no se necesita ningún equipo tipo lector de ELISA y los resultados se establecen por una simple observación visual. El diagnóstico viral con NCM-ELISA se realizaron en las estaciones del CIP en San Ramón y del INIA en Pichanaqui.

Se prospeccionaron campos en producción del cultivo en 23 localidades pertenecientes a 8 distritos y dos provincias (Satipo y Chanchamayo) de la región Junín. Se encontraron y recolectaron dos aislamientos suaves, plantas aparentemente sanas pero que resultaron positivas mediante la técnica de NCM-ELISA.

La repurificación de estos aislamientos de campo permitió obtener aislamientos que segregaban 100 % variantes suaves al inocular plantas sanas, lo que no ocurría con los aislamientos originales de campo.

Las plantas inoculadas con los aislamientos considerados suaves no produjeron síntomas al ser inoculadas posteriormente con aislamientos severos y en condiciones de campo las plantas protegidas con aislamientos suaves lograron producciones comerciales superiores al control sano (que se infectó naturalmente con PRSV), mayor número de frutos por planta y peso por fruta.

Se concluye que la metodología aplicada es exitosa y que existe protección cruzada de aislamientos suaves del virus de la mancha anillada del papayo (PRSV) contra aislamientos severos del mismo virus. Este procedimiento se debería promocionar como una estrategia de control de la enfermedad.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- Benavides, J., Tenorio J., Serna F., E. Rivas, Alcántara J., García A., Velarde D., Fuentes S., Kreuze J., Barker I. & Vivanco W.. 2008. Análisis comparativo de secuencias obtenidas del gen de la proteína de cubierta del virus de la mancha anillada de la papaya (PRSV) nativos del Perú. En resúmenes del: XIII Congreso Latinoamericano de Genética y VI Congreso Peruano de Genética. Lima, Perú. 04-08 Mayo 2008. p. 180.
- Door C., 1986. *Ensayo de protección cruzada con el virus de la mancha anillada del papayo en invernadero. Tesis Ing.* Agr. Lima, Perú. Univ. Agraria La Molina
- Fribourg, C.E. 2007. Virus, Viriodes y Mollicutes de las Plantas cultivadas en el Perú. 219 pp. Servicios y Publicidad WEB SAC. Lima, Peru.
- Fribourg, CE. 1984. El virus de la mancha anillada del papayo en el Perú. *Fitopatología* 19(2):46-47(resumen).
- Marín, J., Malpartida C. & Tenorio J.. 2010. Brotes recientes de la mancha anillada del papayo en el Perú. En: Resúmenes del XXI Congreso Peruano de fitopatología Asociación Peruana de fitopatología. Tarapoto, Perú. 05-10 de Setiembre 2010. p. 73.
- Tenorio, J., Salazar J., Fuentes S., Aguilar C., Malpartida C., Muller G., Cabrera A., Torre de la C., Marín J., Campoverde E.V., Barker I. & Salazar L.F. Strategies to control Papaya ringspot virus in Peru. *Journal of Plant Pathology*. (Italy). 2008. 90(2 Suppl):S2.384.
- Tenorio, J., Salazar J., Fuentes S., Aguilar C., Malpartida C., Muller G., Chuquillanqui C., Cabrera A., De La Torre C., Marín J., Campoverde E.V., Barker I. & Salazar L.F. 2007. Integrated management of Papaya ringspot virus (PRSV) in Peru. 10TH International Plant Virus Epidemiology Symposium. ICRISAT Patancheru, India. 15-19 October 2007. p. 156.
- Tenorio, J., Salazar J., Fuentes S., Aguilar C., Malpartida C., Muller G., Chuquillanqui C., Cabrera A., Marín J., De La Torre C. & Salazar L.F. 2007. Desarrollo de una estrategia para el control de la virosis del papayo en el Perú. *Fitopatología* 42 (2): 49-50.
- Tenorio, J., Salazar J., Fuentes S., Aguilar C., Malpartida C., Muller G., Cabrera A., Marín J., Barrera C. & Salazar L.F. 2006. Virosis del papayo en el Perú: Desarrollo de una estrategia para su control. *AGROENFOQUE*. Año XXI- N0 151:34-36.

Determinación de la Variabilidad de Híbridos (*Stevia sp.*) mediante el Uso de ISSR-PCR

Castro Gamarra, Dorinha Cecilia¹; Valderrama Valencia, Maria del Rosario²

Universidad Católica de Santa María
andorinhacg@hotmail.com¹; marov58@yahoo.com²

RESUMEN

La gran variabilidad morfológica y genética, debido a la reproducción sexual por la que se viene propagando *Stevia*, hace que no se pueda contar con una producción uniforme de esta, en Arequipa uno de los lugares que se dedica a su propagación es el Fundo América ubicado en la Irrigación Santa Rita de Siguan, en el cual se introdujo tres plantas de *Stevia (Stevia rebaudiana x Stevia puberula)* y de la progenie segregante de las mismas se obtuvo muestras para análisis bioquímico y molecular. Por medio del presente estudio se pretende conocer la variabilidad genética de diecinueve muestras seleccionadas de esta progenie para lo cual se utilizaron siete primer tipo ISSR para realizar ampliaciones en PCR, de los cuales ISSR-HB10 e ISSR-17898B son los más informativos para detectar la variabilidad genética. Para analizar estos datos se generó un dendograma en el programa PAST v. 1.94 viéndose que los subgrupos II y III son los que presentan mayor similitud con *Stevia rebaudiana bertonii*.

PALABRAS CLAVE: ISSR, *Stevia rebaudiana*, *Stevia puberula*

ABSTRACT

The great morphologic and genetic variability, due to the sexual reproduction for that one comes spreading *Stevia*, does that it could not rely with a uniform production of this one, in Arequipa one of the places that dedicate of this propagation is Fundo America, which is located in the Irrigation Santa Rita de Siguan, in which one was introduce three *Stevia's* plants (*Stevia rebaudiana x Stevia puberula*) and of the offspring segregate of the same ones samples were obtained for biochemical and molecular analysis. By means of the present study one tries to know the genetic variability of nineteen samples selected of this offspring for which was used seven primers type ISSR were used for realizing amplifications in PCR, of which ISSR-HB10 and ISSR-17898B are the most informative to detect the genetic variability. To analyze this information were generated a dendogram in the program PAST v. 1.94 being seen that the subgroups the II and III are those that present major similarity with *Stevia rebaudiana bertonii*.

INTRODUCCION

En el 2004 Fundo América S.A.C introdujo en el distrito de Santa Rita de Siguan- Arequipa, híbridos de *Stevia* obtenidas del cruzamiento de *Stevia rebaudiana bertonii x Stevia puberula*. Los estudios moleculares en los últimos años han sido de gran ayuda para la estimación de la diversidad genética, estudio de relaciones filogenéticas y desarrollo de mapas de ligamiento, ya que usan ADN, él cual es más preciso al brindarnos información molecular; por la que sería de gran ayuda aplicar marcadores moleculares para poder determinar la variabilidad de las muestras que deseamos diferenciar.

Los ISSRs se han utilizado mucho por su rápida implementación y por su bajo costo para establecer diversidad genética (Awasthi et al., 2004; Jin et al., 2003; Zizumbo et al., 2005), para identificar cultivares estrechamente relacionados (Carvalho et al., 2004; González et al., 2005), para estudiar procesos evolutivos, biogeografía, así como aspectos relacionados con la ecología de algunas especies vegetales (Liston et al., 2003; Wallace, 2003) por esta razón los ISSR amplificados por técnica de PCR, nos brindan presencia y ausencia de bandas en geles de agarosa construyendo con esos datos matrices de similitud, que al ser ingresados en programas como Past v. 1.94b, nos brindan dendogramas, gráficos de agrupamiento que representan el porcentaje de similitud entre las muestras.

De esta manera podemos identificar las muestras que tienen mayor relación con *Stevia rebaudiana*, que es uno de sus parentales

MATERIALES Y METODOS

Selección de Muestras: Se recolectaron 19 muestras; *Stevia rebaudiana sp e híbridos de Stevia rebaudiana Bertonii X Stevia puberula*, provenientes de Fundo América- Santa Rita de Siguan, Arequipa-Perú. Las muestras son denominadas por planta madre (M), híbridos de tallo único (TU), híbridos de tallo ramificado (TR).

Extracción y Amplificación: La extracción fue realizada a partir de tejido foliar mediante el método de extracción CTAB (Doyle & Doyle, modificado con Cloroformo-Octanol, 1993). La amplificación del ADN se realizó con 07 primers ISSR de *Stevia* (ISSR 844B, ISSR 844B, ISSR 17898 B, ISSR HB-10, ISSR HB-10, ISSR HB-11, ISSR HB-12, ISSR HB-11). La mezcla de amplificación contuvo 30ng/μL de ADN molde, 0.02 U/μL de Taq polimerasa, 10X Buffer, 25mM MgSO₄, 0.2mM dNTPs, 0.6μM de primer y agua ultrapura. Las condiciones de amplificación fueron para la

desnaturalización (95 °C x 30 seg.), anilamiento entre 30-50 °C, calculada para cada primer x 30 min, elongación a 70 °C x 30 seg., seguido de una extensión final a 72 °C x 2 min.

El producto de la PCR, fue analizado por electroforesis horizontal en geles de agarosa al 1%, con 0.5 X de TBE y teñidos con bromuro de etidio.

Análisis de la variabilidad: El análisis de las bandas se realizó mediante fotografías ingresadas al programa Total Lab TL100 para la construcción de la matriz binaria. La variabilidad genética se usó la distancia genética entre las muestras de *Stevia* lo cual se representó en un dendograma utilizando el programa Past 1.94b.

Matriz de similitud: Para construir la matriz de similitud se tomaron datos de presencia y ausencia de bandas generadas por cada marcador en cada muestra, de esta manera construir una matriz a ser analizada por Past v. 1.94b, la cual fue usada para calcular valores de similitud entre cada genotipo usando los coeficientes de similitud Jaccard y Dice.

Dendograma: Usando la herramienta Multivar, la opción Cluster analysis, del programa Pas v. 1.94t, se construyeron los dendogramas, observando el coeficiente de relación Cofenético.

RESULTADOS Y DISCUSION

Similitud Genética y Análisis del Dendograma basado en análisis con ISSR: El dendograma (Imagen N°1) construido permite separar el árbol genético de acuerdo a los porcentajes de similitud entre las muestras, diferenciándose cinco grandes grupos como se observa. El cluster obtenido, nos permite separar el grupo de *Stevia rebaudiana* y aquellas posibles muestras que heredaron caracteres similares a este parental de las que tienen menor similitud.

El coeficiente de correlación cofenético (Acuña, 2009), puede ser usado para medir la estructura jerárquica del dendograma que representa a las verdaderas distancias. Se define como la correlación entre las $n(n - 1)/2$ pares de disimilaridades y sus distancias cofenéticas del dendogramas (es la distancia de similitud a la cual dos observaciones que aparecen en un mismo cluster fueron consideradas juntas por primera vez). Es decir el coeficiente usa las presencias y ausencias para mediante una fórmula decirnos cuál de las asociaciones del dendograma es más certera, de esta manera podemos seleccionar el CLUSTER que tenga mayor precisión en la asociación de las muestras empleadas. Las muestras de los grupos II y III comparten menos del 50% de parentesco con *Stevia rebaudiana*, el otro porcentaje se podría deber al otro parental.

En la amplificación de las diecinueve muestras los marcadores ISSR-HB10 e ISSR-17898B son los más informativos para detectar la variabilidad genética de las 19 muestras de *Stevia*, los marcadores ISSR-17898B, ISSR-844B, ISSR-17898A, ISSR-HB 11, mostraron amplificación de las secuencias mientras los marcadores ISSR-HB12 e ISSR-HB 15, no mostraron amplificación con ninguna de las muestras a analizar. Así mismo la muestra N1 (control negativo) pese a presentar caracteres morfológicos similares a *Stevia* no amplificó fragmento alguno para ninguno de los marcadores. Los marcadores moleculares han permitido separar grandes grupos, Los subgrupos, I (TR-02, M1), IV (M3, TU-13), V (TR-01, TU-02, TU-10, TR-04), VI (TU-11), conforman las muestras que comparten menos bandas con *Stevia rebaudiana*. El subgrupo II conformado por las muestras M2, TRC-01, TR-14, TU-09 y TR-10 y subgrupo III conformado por TU-12, TR-03 y TUC-09 presentan mayor porcentaje de similitud por compartir más bandas con *Stevia rebaudiana*.

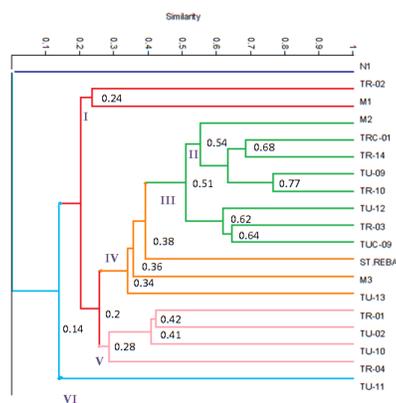


Fig. 01: Dendograma empleando el coeficiente de similitud Jaccard

REFERENCIAS

- AWASTHI, A, NAGARAJAL, G, NAIK G; KANGINAKUDRU, S, THANGAVELU, K, NAGARAJU, J. Genetic diversity and relationships in mulberry (genus *Morus*) as revealed by RAPD and ISSR marker assays. *BMC Genetics* 5:1. 2004
- CARVALHO, M.; HOPKINS, M; MITCHELL, S; KRESOVICH, S;. MONTENEGRO, J; FERREIRA M. Genetic diversity of peanut (*Arachis hypogaea* L.) and its wild relatives based on the analysis of hypervariable regions of the genome. *BMC Plant Biology* 4: 1186-1471. 2004
- CHIA WONG, J,. Caracterización molecular mediante marcadores ISSR de una colección de 50 árboles clonales e híbridos de cacao (*Theobroma cacao* L.) de la UNAS-Tingo María. 2009
- DOYLE, J.J. Y DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12:13–15. 1990
- HEIKAL, A.H., BADAWAY, O.M. AND, AFAF M.H.. Genetic Relationships among some stevia (*Stevia Rebaudiana Bertoni*) accession based on ISSR Analysis.: Res.2 1-5. 2008
- LISTON, A., WILSON, W, ROBINSON, P, DOESCHER, N, HARRIS, T SVEJCAR.. The relative importance of sexual reproduction versus clonal spread in an aridland bunchgrass. *Oecologia* 137:216-225. 2003
- NUEZ, F, CARRILLO, J,. Los Marcadores Genéticos en la mejora Vegetal. Ed. Universidad Politecnica de valencia. Cap. 1-3. 2000
- NÚÑEZ, C, RODRÍGUEZ, J, NIETO, R, BARRIENTOS, A, Construcción de dendrogramas de taxonomía numérica mediante el coeficiente de distancia χ^2 : una revisión. 2003
- PICCA, A, HELGUERA, M, SALOMON, N, CARRERA, A, Marcadores Moleculares, Biotecnología y Mejoramiento Vegetal. Ed Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria Argentina. Cap. IV . 2004
- SAMBROOK, J; RUSSELL, D. Molecular Cloning : A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York. 2001
- SÁNCHEZ, I. Búsqueda y aislamiento de marcadores moleculares en *Pleurotus ostreatus* (en línea). Navarra, España. 2002.
- VALDERRAMA, M, Uso de marcadores moleculares en el estudio de la resistencia a hopo (*Orobanche crenata* Forsk) en guisantes (*Pisum sativum* sp.). 2001.

Polimorfismo en la longitud de fragmentos amplificados (AFLP) en la caracterización de ochenta accesiones de *Theobroma cacao* L. (cacao) del banco de germoplasma del Instituto de Cultivos Tropicales (ICT).

Juan Gallegos Díaz * María Valderrama Valencia
Universidad Católica de Santa María

Resumen:

En el presente estudio se realizó con la finalidad de caracterizar molecularmente 80 accesiones de cacao del banco de germoplasma del Instituto de Cultivos Tropicales (ICT), localizado en Tarapoto departamento de San Martín, este material tiene diferentes procedencias genéticas y geográficas como son: grupo ICT (provincias Mariscal Cáceres y Tocache), Grupo ríos tributarios amazónicos y Grupo híbridos internacionales. La extracción del ADN se trabajó según el protocolo de Doyle & Doyle (1990) y la amplificación PCR fue mediante la técnica de AFLP (Polimorfismo en la longitud de los fragmentos Amplificados). Se usaron 9 cebadores selectivos, registrándose un total de 135 loci de los cuales 97 mostraron polimorfismo. El análisis del poder discriminante de los cebadores mostró valores óptimos, ya que se registraron índices de contenido polimórfico (PIC) de hasta 0.28 para el par de cebadores EcoRI-ACA/MseI-CAT, se obtuvo un dendrograma por el método no jerárquico de Neighbour-Joining con el coeficiente de Jaccard utilizando el programa PAST versión 2.1b. Los parámetros de la variabilidad poblacional se calcularon con la ayuda del programa POPGENE. Se determinó que la población Mariscal Cáceres posee mayor variabilidad que el resto de poblaciones ($h = 0.20$), por otro lado, la población correspondiente a Ecuador-Perú mostraron cierta cercanía a la población Amazónica.

Abstract

This study was conducted in order to molecularly characterize 80 accessions of cocoa genebank of the Institute of Tropical Crops (ICT), located in Tarapoto San Martín department, this material has different genetic and geographical origins such as: ICT group (Mariscal Cáceres provinces and Tocache), Group Amazonian rivers and tributaries international hybrid group. The DNA extraction protocol was of Doyle & Doyle (1990), and PCR amplification was according to AFLP (Length Polymorphism amplified fragment) technique. 9 selective primers were used, scoring a total of 135 loci amplifications, from which 97 exhibit polymorphism. The analysis of the discriminating power of the primers showed optimal values as indices of polymorphic content (PIC) of up to 0.28 were recorded for primer pair EcoRI-ACA/MseI-CAT, a dendrogram was obtained by the non-hierarchical method neighbour-joining with the Jaccard coefficient using the software PAST version 2.1b. The population variability parameters were calculated with the help of POPGENE program. These analysis showed that the population Mariscal Cáceres has greater variability than other populations ($h = 0.20$). For other side, population belonging to Ecuador-Peru showed a close relationship with the population from the Amazon.

Introducción.

La Amazonia peruana contiene una gran biodiversidad en cultivos de cacao (*Theobroma cacao* L.), esta planta tiene una elevada importancia económica y social, las tareas de mejoramiento genético han demandado una adecuada caracterización a nivel morfológico, sin embargo la caracterización molecular aún es insuficiente. El cacao es considerado como uno de los cultivos perennes más importantes del planeta (Almeida A. y Valle R., 2007). *Theobroma cacao* L. (cacao) es el cultivo de mayor importancia comercial a nivel mundial de las 22 especies que comprenden el género *Theobroma* (Schnell R. et al., 2005). La demanda actual del cacao viene en aumento incluso por la agroindustria nacional que importa un promedio de 3 500 TM al año de grano de cacao debido a que la producción nacional no consigue cubrir la demanda. La constante demanda y la creciente producción del grano de cacao, lleva a plantear estrategias para mejorar la calidad en los siguientes aspectos: El Perú es uno de los centros de diversidad del cacao, pero las campañas de colecta y caracterización de germoplasma promisorio son escasas (Chia J., 2009). La diversidad genética del cacao comprende el conjunto de poblaciones silvestres y domesticadas, con distinto origen genético y grado evolutivo, que ocupan un nicho ecológico específico y, que teniendo características semejantes y distintivas, se muestran variables o diferentes. El análisis de la diversidad genética usando marcadores moleculares, permite determinar perfiles genéticos a nivel del ADN (“genotipificación” o ADN “fingerprinting”), muy útiles para la identificación y diferenciación inequívoca de cualquier accesión en un banco de germoplasma.

Materiales y métodos.

Muestras: Se trabajó con 80 accesiones de cacao provenientes del banco de germoplasma del Instituto de Cultivos Tropicales del Perú (ICT), de las cuales 43 de estas accesiones son originarias de las localidades de Juanjui en la provincia de Mariscal Cáceres y Tocache en la provincia de Tocache, el segundo grupo contiene 28 accesiones originarias de cultivos silvestres de las orillas de los ríos tributarios del río Amazonas entre las regiones Amazonas y Loreto, además de 9 clones híbridos cuyo origen es Trinidad y Tobago, Costa Rica, Ecuador y Perú

Aislamiento y purificación: Para el aislamiento del ADN de las hojas de cacao, previamente desecadas con silica gel, se utilizó el método de Doyle J. y Doyle J. (1990), modificado por el departamento de biología molecular del Instituto de Cultivos Tropicales (ICT). Se pesó 0.15 gr. de muestra picada, y se colocó en 700 μ l de tampón CTAB 2X a 65 °C y 2 μ l. de β -mercaptoetanol. La purificación se dio realizando lavados con 800 μ l de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1), 300 μ l de octanol: alcohol isoamílico (24:1), y finalmente isopropanol al 96%. Se realizó un último lavado del pellet con etanol al 70%, por 5 minutos, centrifugándolo a 10 000 r.p.m. Posteriormente, se re-suspendió el precipitado de ADN en 50 μ l de agua ultra pura y adicionó 2 μ l de RNAsa e incubó a 37 °C por 2 horas. La determinación de la pureza y concentración del ADN; Se realizó en un espectrofotómetro Thermo Scientific (Genesys 10S UV Vis), se leyó a 260 nm. y 280 nm. para calcular la concentración de la muestra de ADN. La evaluación de la integridad del ADN extraído se realizó con electroforesis en gel de agarosa al 1 % con 2 μ l de bromuro de etidio.

Aplicación de AFLP: La técnica de AFLP se realizó según el método de Vos et al., 1995, se inició con una digestión del ADN con EcoR I y Mse I. por 2 horas a 37°C y se almacenó a -10°C, luego se añadió adaptadores específicos a los sitios de los cortes, se usó los adaptadores EcoR I (F' 5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3' y R' 5'-AATTGGTACGCAGTCTAC-3') Mse I (F' 5'-GACGATGAGTCCTGAG-3' y R' 5'-TACTCAGGACTCAT-3') unidos por ligasa, y se amplificó con PCR usando cebadores pre selectivos (+1/+1) Pre-EcoRI (5'-GACTGCGTACCAATTCA-3') y Pre-MseI (5'-GATGAGTCCTGAGTAAC-3') y luego se dio una selección específica con cebadores selectivos (+3/+3): EcoRI-ACT + MseI-CAT, EcoRI-ACA + MseI-CAA, EcoRI-ACA + MseI-CAT, EcoRI-ACC + MseI-CTA, EcoRI-AAC + MseI-CAC, EcoRI-AAC + MseI-CTC, EcoRI-AAG + MseI-CTA, EcoRI-AGC + MseI-CTA, EcoRI-AGC + MseI-CAC. Los productos de esta última amplificación por PCR se separaron, en gel denaturante de poliacrilamida. (PAGE), La tinción y el revelado se realizaron según los protocolos de Bassam B. et al., (1991) usando nitrato de plata (AgNO₃) (2 g/l), Los geles resultantes se documentaron con la ayuda de una cámara digital.

Análisis de la variabilidad: Con los marcadores se construyó una matriz de datos, se calcula el índice de contenido polimórfico (PIC) y se hace el análisis de agrupamiento por el método de Neighbour joining del programa PAST versión 2.1b, usando el coeficiente de similitud de Jaccar. Con los resultados se realiza el análisis de la variabilidad molecular entre poblaciones, y se estima el índice de contenido polimórfico entre poblaciones.

Resultados y discusión

Índice de contenido polimórfico (PIC): Se evaluó los valores de índice de contenido polimórfico (PIC) (ver tabla 1) de cada una de las combinaciones de cebadores específicos, los valores más altos fueron documentados para la combinación de cebadores EcoRI-ACA / MseI-CAT con PIC igual a 0.28 y un porcentaje de polimorfismo de 83.3% y para EcoRI-ACA / MseI-CAA con un PIC 0.22 y un porcentaje de polimorfismo de 84.2%, estas combinaciones pueden ser considerados como combinaciones de cebadores óptimos de acuerdo con Saunders et al., (2000) quienes afirma que los cebadores óptimos producen fragmentos de ADN fácilmente puntuables que muestran la reproducibilidad entre las muestras y un alto número de loci polimórfico para elucidar la diversidad y discriminar entre muestras.

Tabla N° 1: resultados del contenido de información de polimorfismo obtenido de los 9 pares de cebadores específicos de AFLP, en la caracterización molecular de 80 accesiones de *Theobroma cacao L.*

COMBINACION DE CEBADORES	Nº LOCI	LOCI MONOMORFICO	LOCI POLIMORFICO	% LOCI POLIMORFICAS	PIC PROMEDIO
EcoRI-ACT + MseI-CAT	12	5	7	58.3	0.1
EcoRI-ACA + MseI-CAA	19	3	16	84.2	0.22
EcoRI-ACA + MseI-CAT	12	2	10	83.3	0.28
EcoRI-ACC + MseI-CTA	13	3	10	76.9	0.17
EcoRI-AAC + MseI-CAC	7	3	4	57.1	0.17
EcoRI-AAC + MseI-CTC	17	5	12	70.6	0.13
EcoRI-AAG + MseI-CTA	19	4	15	78.9	0.12
EcoRI-AGC + MseI-CTA	22	9	13	59.1	0.1
EcoRI-AGC + MseI-CAC	14	4	10	71.4	0.12
TOTAL	135	38	97	71.9	

Análisis de similitud y Agrupamiento: Usando el programa PAST versión 2.1b (Hammer O. et al, 2001) se generó la matriz de distancia genética entre las 80 accesiones estudiadas, utilizando el coeficiente de correlación Jaccard (Sneath, 1908). Las asociaciones entre líneas, a partir de los datos fueron reveladas mediante el método no jerarquizado de Neighbour joining (Saitou N. y Nei M. 1987) que es un sistema no métrico de agrupación. Este permitió agrupar a las 80 accesiones de cacao en 4 cluster marcadamente definidos (Fig. 1)

Análisis de la variabilidad molecular entre poblaciones: Se constituyeron 5 poblaciones las que agruparon a las accesiones de Mariscal Cáceres, Tocache, Amazónicas, Perú – Ecuador y Trinidad y Tobago – Costa Rica, para realizar los análisis entre las poblacionales y dentro de las poblaciones.

Porcentaje de loci polimórfico (%PPL): El resultado del porcentaje de loci polimórfico entre poblaciones fue de 71.85%; que indica que como grupo perteneciente al banco de germoplasma del Instituto de Cultivos Tropicales presenta un alto potencial de polimorfismo y por tanto podría ser fuente de riqueza alélica para trabajos de mejoramiento genético futuros

En cuanto a las poblaciones independientes se observa que las poblaciones de Mariscal Cáceres y Tocache tienen los valores más altos de porcentaje de loci polimórfico 55.56% y 54.07% respectivamente, Gallegos (2013), esto muestra de una manera superficial que en términos de polimorfismo la mayor riqueza se encuentra en estas regiones, quizá influenciada al manejo de los agricultores sobre estas accesiones. Zhang D. et al (2006) indica que estas localidades corroboran la hipótesis de que la Amazonía Peruana alberga un alto nivel de diversidad

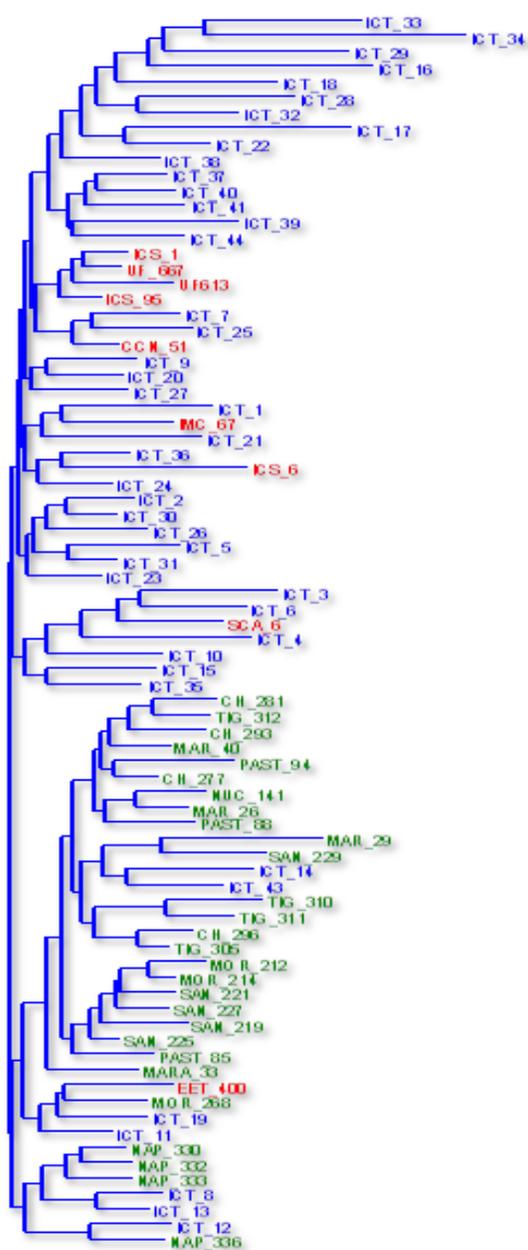


Figura N° 1: Dendrograma resultante de las 80 accesiones de *Theobroma cacao L.* del banco de germoplasma del Instituto de Cultivos Tropicales (ICT), con el método no jerarquizado de Neighborur Joining.

genética del cacao, finalmente señala que la introducción de poblaciones de semillas como parte de planes de mejora del cultivo en zonas cacaoteras peruana está cambiando el espectro de hipótesis de que la Amazonía peruana alberga un alto nivel de diversidad genética del cacao. Finamente señala que la introducción de poblaciones de semillas como parte de planes de mejora de cultivo en zonas cacaoteras peruana está cambiando el espectro de germoplasma de cacao en estas regiones. Por tal motivo las población amazónica mostró un valor de 44.89% lo que guarda lógica con dichas aseveraciones. Las poblaciones Internacionales Trinidad y Tobago - Costa Rica (17.78%) y Perú - Ecuador (23.7%) tuvieron valores relativamente bajos, estas diferencias pueden deberse a que son genotipos diferentes, con orígenes diferentes, de esta manera Hasting K. 1997 indica que variación en la estructura genética describe la variación del genotipo entre los individuos..

El resultado de porcentaje de loci polimórfico entre poblaciones fue de 71.85%; que indica que como grupo perteneciente al banco de germoplasma del Instituto de Cultivos Tropicales presenta un alto potencial de polimorfismo y por tanto podría ser fuente de riqueza alélica para trabajos de mejoramiento genético futuros.

Agradecimientos

Agradezco al Instituto de Cultivos Tropicales por darnos la facilidad de realizar la presente tesis como parte del proyecto que llevan sobre cacao.

Bibliografía.

- Abadie T., Berreta A.** 2001. Caracterización y evaluación de recursos filogenéticos, Montevideo, Uruguay. PROCISUR. s.p.86: 1474–486.
- Acquadro, A., Portis, E., and Lanteri, S.** 2002. Development of microsatellite markers in pepper (*Capsicum annum L.*) using microsatellite-amplified fragment length polymorphism (MAFLP). *Capsicum Eggplant Newsl.* 21: 25–28.
- Arévalo E., Ortiz B., Zuñiga C., Gonzales V.** 2005. Selección de plantas de cacao resistentes a la moniliasis usando savia del floema y fluidos embrionarios de frutos jóvenes, *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología* 76: 86-88.
- Arguello O., Mejia L., Palencia C.** Origen y descripción botánica. In *Tecnología para el mejoramiento de sistemas de producción de cacao*. 2000, Corpoica, Bucaramanga, Colombia. p 10 – 12.
- Bassman B., Caetano G., Gresshoff P.** *Anal. Biochem.* 196: 80-83. Bellon, M.R., J. Berthaud, M. Smale, J.A. Aguirre, S. Taba et al. 2003. Participatory landrace selection for on farm conservation: An example from the Central Valleys of Oaxaca. 1991, México. *Genetic Resources and Crop Evolution* 50:401-416.
- Chia Wong J.** Caracterización molecular mediante marcadores ISSR de una colección de 50 árboles clonales e híbridos de cacao (*Theobroma cacao L.*) de la UNAS. [Tesis de Maestría]. Tingo María: Universidad Nacional Mayor De San Marcos; 2009
- Christensen M, Sunde L, Bolund L, Orntoft TF.** Comparison of three methods of microsatellite detection. *Scandinavian Journal Clinical and Laboratory Investigation* 1999. 59:167-178.
- Doyle J., Doyle J.** Isolation of plant DNA from fresh tissue. 1990, *Focus* 12: 13-15.
- Duke J.** *Theobroma cacao L.* Handbook of Energy Crops. 1983
- Fory Sanchez A.,** Caracterización y análisis molecular de la diversidad genética de la colección colombiana de lulo (*Solanum quitoense lam*) y seis especies relacionadas de la sección *Lasiocarpa*. [tesis de Maestría]. Universidad Nacional De Colombia, Sede Palmira; 2005.
- Gama R., Cadima Z.** Efectos de fertilización sobre sistema radicular de cacao en suelos de "tabuleiros" del sur de Bahía, Brasil. 1991, *Turrialba (IICA)* 41(2): 135-141.
- Ji K., Zhang D., Motilal L., Boccara M., Lachenaud P., Meinhardt L.** Genetic diversity and parentage in farmer varieties of cacao (*Theobroma cacao L.*) from Honduras and Nicaragua as revealed by single nucleotide polymorphism (SNP) markers. *Genet Resour Crop Evol.* 2012; Jun
- July, W.** Comportamiento de estacas de tres variedades de cacao (*Theobroma cacao L.*) a tres tratamientos de fitohormonas en la región de Alto Beni. Tesis Ingeniero Agrónomo. UMSA, La Paz BO 98 p, 2002.
- Martínez W.** Caracterización morfológica y molecular del Cacao Nacional Boliviano y de selecciones élites del Alto Beni, Bolivia. [tesis de Maestría]. CATIE Turrialba. Costa Rica. 2007
- Vázquez A., Molina F., Nuñez J., Salvador M.,** Potencial de los Marcadores Moleculares para el Rescate de Individuos de *Theobroma cacao L.* de Alta Calidad. 2012, *BioTecnología*, Vol. 16 No. 1
- Vos P., Hogers R., et al.** AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. 1995, *Nucleic Acids Res.* 23(21):4407-4414.
- Warburton M., Crossa J.** Data Analysis in the CIMMYT Applied Biotechnology Center. For Fingerprinting and Genetic Diversity Studies. 2002
- Zhang D, Arevalo E., Mischke S., zuniga L., barreto A., adriazola del águila J.** Genetic diversity and structure of managed and semi-natural populations of cocoa (*theobroma cacao*) in the Huallaga and Ucayali valleys of Peru. 2006 *Annals of Botany*.
- Zhang D., Arevalo E., Motilal L., Baligar V., Bailey B., Zuniga; Cernades L., et al.** Dissecting genetic structure in farmer selections of *theobroma cacao* in the Peruvian amazon: implications for on farm conservation and rehabilitation. 2011. *Tropical plant boil.*
- Zhang D., Boccara M., Motilal L., Mischke S., Johnson E., Butler D.** Molecular characterization of an earliest cacao (*Theobroma cacao L.*) collection from Upper Amazon using microsatellite DNA markers. *Tree Genet. & Genomes.* 2009; vol. 5: 595–607.
- Zhang D., Boccara M., Motilal L., Butler D., Umaharan P., Mischke S., Meinhardt L.** Microsatellite variation and population structure in the 'Refractario' cacao of Ecuador. 2008, *Conserv. Genet.* 9: 327-337.
- Zhang D., Mischke S., Goenaga R., Hemeida A. & Saunders J.** Accuracy and reliability of high-throughput microsatellite genotyping for cacao clone identification. 2006, *Crop Sci.* 46: 2084-2092.
- Zhang J., McStewart J.** Economical and rapid method for extracting cotton genomic DNA. 2000, *Journal of Cotton Science* 4: 193-201.

Cruzas simples y dobles en quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) usando marcadores moleculares y mayores distancias genéticas.

A.Mujica¹, K.Smith², W.Smidth³, B.Haussmann³, E.Chura¹, E. Mamani¹ y A.Canahua¹

¹Universidad Nacional del Altiplano, Puno, Perú. amhmujica@yahoo.com

²Universidad de Hoheinheim- Alemania. karl.schmid@uni.hohenheim.de

³ KWS- Alemania. walter.schmidt@kws.com

RESUMEN

La quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.), está alcanzando importancia mundial por su alto contenido proteico y balance ideal de aminoácidos esenciales, considerado por FAO como alimento nutraceutico y orthomolecular para la humanidad. La investigación, busca mejorar las características deseadas de la quinua, mediante cruzas simples y dobles y con ayuda de la genética molecular determinar distancias genéticas entre progenitores para acortar y facilitar la hibridación, utilizando dos ambientes para la autofecundación y selección (Puno y Arequipa); se propone desarrollar nuevas variedades por selección convencional, para las diferentes condiciones agroclimáticas del Perú, donde se seleccione, demostrar la utilidad de marcadores genéticos, pronosticar varianzas de segregación de poblaciones de quinua segregantes. Se utilizó ocho genitores (Salcedo INIA, Huariponcho, Choclito, Chullpi rojo, Pasankalla, Negra Kollana, Kancolla, Pandela rosada), determinado el valor de similitud genética y distancias genéticas en la Universidad Hohenheim-Alemania, utilizando la metodología GBS. Se efectuó 28 cruzas simples (setiembre 2011 a abril 2012), obteniendo semillas F1, siguiendo la metodología descrita para quinua. Las F1 de cruzas simples más distantes y más cercanas, fueron cruzadas, obteniendo seis cruzas dobles, luego autopolinizadas en Puno y Arequipa para acortar tiempo, estando actualmente en S2 las cruzas dobles y S4 las cruzas simples. Cada generación de autofecundación, fue caracterizada morfológicamente para determinar posibles genotipos disponibles y aumentar homocigosis. En las cruzas dobles se han polinizado 494 flores, obteniendo 397 semillas híbridas dobles (80.3 %).

ABSTRACT

Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.), is reaching global significance for its high protein content and ideal balance of essential amino acids, considered by FAO as nutraceutical and orthomolecular food for humanity. The research seeks to improve the desired characteristics of quinoa, with simple, double crosses and using molecular genetics to determine genetic distances between parents to shorten and facilitate hybridization using two environments for selfing and selection (Puno and Arequipa); aims to develop new varieties by conventional breeding for different agro-climatic conditions of Peru, where select, demonstrate the utility of genetic markers to predict segregation variance in segregating populations quinoa. Eight parents (INIA Salcedo, Huariponcho, Choclito, Chullpi, Pasankalla, Negra Kollana, Kancolla, Pandela rosada) was used, determined the value of genetic similarity and genetic distances in the Hohenheim University, Germany, using the GBS methodology. 28 single crosses (September 2011 to April 2012) was performed, obtaining F1 seeds, following the methodology described for quinoa. The F1 more distant and closer single crosses were crossed, getting six double crosses, then self-pollinated in Puno and Arequipa to shorten your time, currently being in the S2 and S4 double crosses single crosses. Each generation of selfing was morphologically characterized for possible genotypes available and increase homozygosity. In the double crosses 494 flowers were pollinated, hybrid seeds double obtaining 397 (80.3 %).

INTRODUCCIÓN

La quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.), cultivo originario de los Andes, está alcanzando importancia mundial por su alto contenido de proteínas y balance ideal de aminoácidos esenciales siendo calificado por FAO como el mejor alimento nutraceutico y orthomolecular para la humanidad. La diversidad genética disponible es amplia y requiere caracterización morfológica y molecular para poder utilizar adecuadamente en el mejoramiento genético, puesto que se necesita aumentar los rendimientos, encontrar genotipos de alta resistencia al Mildew (*Peronospora variabilis*), resistencia a factos adversos del cambio climático y adaptación a diferentes condiciones agroclimáticas. El genetista moderno busca mejorar las características agronómicas, de producción y arquitectura de planta, que le permita una cosecha más rápida, eficiente y con menores desperdicios y por ello, utiliza la agrobiodiversidad para seleccionar y recombinar caracteres hasta encontrar genotipos deseados con mejor adaptación, producción y resistencia a factores abióticos adversos. La investigación, busca mejorar las características deseadas de la quinua, mediante cruzas simples y dobles y con ayuda de la genética molecular determinar distancias genéticas entre los progenitores para acortar y facilitar el proceso de hibridación y mejoramiento de esta especie, utilizando diferentes ambientes (Puno y Arequipa) para los trabajos de autofecundación y selección, teniendo como meta desarrollar nuevas variedades por selección convencional, para las condiciones agroclimáticas del Perú, donde se efectúe las selecciones, demostrar la utilidad de marcadores genéticos para pronosticar varianzas de segregación de poblaciones de quinua segregantes.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los trabajos se inician en Puno, Universidad Nacional del Altiplano, sembrando 8 variedades de quinua utilizados como genitores (1. Salcedo INIA (SAL), 2.Huariponcho (HUA), 3. Choclito (CHO3), 4. Chullpi rojo (CHU), 5. Pasankalla (PAS), 6.Negra Kollana (COL), 7.Kancolla (KCA) y 8.Pandela rosada (PAN)), con 4 repeticiones y 3 fechas de siembra, para obtener polen viable y ovario receptivo. De las plántulas al estado de 8 hojas verdaderas, se obtuvieron hojas tiernas, que fueron desecadas con gel, luego preparadas, identificadas y embolsadas siguiendo el protocolo para dicho fin y determinado el valor de similitud genética y distancias genéticas en la Universidad de Hohenheim- Alemania, utilizando la metodología GBS (Elshire, *et al*; 2011). Luego se efectuaron 28 cruzas simples posibles ($8 \times 7 / 2 = 28$), de setiembre 2011 a abril 2012, obteniendo semilla F1 y siguiendo la metodología descrita por Mujica, *et al* (2013a). Las F1 de cruzas simples más distantes y más cercanas, seleccionadas, tres en cada caso, fueron cruzadas, obteniendo cruzas dobles, seguidamente se efectuó autopolinizaciones S0, S1, S2, S3 y S4, entre Puno y Arequipa de las cruzas simples, tanto en invernadero como en campo para ganar tiempo y las semillas F1 de las cruzas dobles se han autopolinizado en

invernadero y campo en Puno y Arequipa, estando actualmente en la S2 las cruzas dobles y S4 las cruzas simples. En cada generación de autofecundación, se ha efectuado caracterizaciones morfológicas para determinar los posibles genotipos disponibles y aumento de homocigosis.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se realizó 28 cruzas simples posibles entre los 8 genitores, obteniendo semillas F1 en cada craza, que se observa en la Tabla 1, demostrando que la metodología de hibridación utilizada es adecuada y permite obtener semillas híbridas en cada caso.

Tabla 1. Número de Semillas F1 obtenidas por repetición en cruzas simples. UNA-Puno. 2012.

CRUZAS	REPETICIONES				TOTAL
	I	II	III	IV	
1X2	2	7	0	10	19
1X3	2	2	0	2	6
1X4	0	5	0	0	5
1X5	4	1	2	1	8
1X6	0	5	2	0	7
1X7	5	1	0	1	7
1X8	3	0	0	1	4
2X3	7	8	10	7	32
2X4	2	6	2	0	10
2X5	5	12	0	1	18
2X6	7	9	7	8	31
2X7	10	4	7	8	29
2X8	2	13	8	4	27
3X4	0	1	0	0	1
3X5	2	0	2	3	7
3X6	0	1	3	1	5
3X7	1	0	5	6	12
3X8	0	5	6	2	13
4X5	5	3	4	8	20
4X6	2	3	4	0	9
4X7	0	1	2	6	9
4X8	0	0	3	8	11
5X6	0	0	0	2	2
5X7	0	0	0	1	1
5X8	0	2	2	0	4
6X7	3	3	7	10	23
6X8	0	6	1	6	13
7X8	10	9	8	2	29

La determinación de las distancias genéticas se efectuaron en la Universidad de Hohenheim, Alemania, cuyos resultados indican que las accesiones más distantes son: Kcancolla con Huariponcho, Salcedo-INIA con Huariponcho y Pasankalla con Kcancolla y las emparentadas: Kancolla con Negra Collana, Salcedo- INIA con Pandela y Salcedo INIA con Negra Collana. Los marcadores utilizados fueron obtenidos por el método de GBS (Genotyping-by Sequencing), debido a una alta proporción de datos por parejas y exclusión de otros, obteniendo el dendograma. Las semillas híbridas F1 distantes y cercanas seleccionadas, procedentes de cruzas simples, fueron autofecundadas tanto en invernadero y campo, en Puno y Arequipa, encontrándose actualmente en la S4; luego los 6 híbridos F1 procedentes de cruzas simples distantes (3) y cercanas (3), fueron sembradas en Puno, en 3 fechas de siembra del 30 noviembre al 16 diciembre del 2012, con 4 repeticiones y al llegar a floración fueron hibridadas en invernadero del 02 febrero al 10 abril del 2013, obteniendo cruzas dobles, para disponer de mayor variabilidad y posteriormente efectuar autofecundaciones para obtener homocigosis y luego selección, disponiendo de semillas híbridas de cruzas dobles en total 397 semillas (236 distantes y 161 cercanas) que se muestra en el Cuadro 2, incluido el número de flores polinizadas y semillas híbridas logradas, con un porcentaje promedio del 80.3% de semillas conseguidas después de la hibridación.

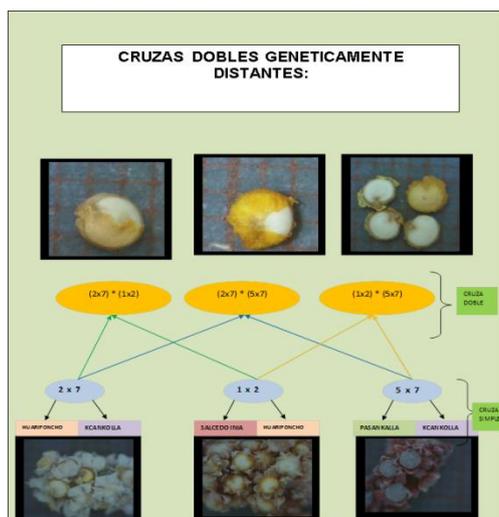
Tabla 2. Cruzas dobles de híbridos F1 distantes y cercanos genéticamente, flores polinizadas y semilla híbridas dobles obtenidas.

Cruzas seleccionadas	Flores polinizadas	Semillas obtenidas	%	Distancias genéticas
1.(2x7) X (1x2)	98	69	70.4	Distante
2.(2x7) X (5x7)	77	70	90.9	Distante
3.(1x2)X (5x7)	113	97	85.84	Distante
1.(6x7) x (1x8)	44	29	65.9	Cercana

2.(6x7) x (1x6)	68	44	64.7	Cercana
3.(1x8)x (1x6)	94	88	93.61	Cercana
Total	494	397		
Promedio			80.36	

En la Figura 1, se muestra las cruzas dobles distantes genéticamente, con las semillas híbridas obtenidas (Mujica *et al*, 2013b). Los híbridos dobles de cruzas distantes y cercanas fueron autofecundadas (S0) en Arequipa de octubre a enero 2012 y cosechadas en Junio 2013, luego la S1 sembradas en enero del 2014 en Characato- Arequipa, encontrándose actualmente en plena autofecundación.

Figura 1. Semillas híbridas obtenidas de las cruzas dobles distantes y cercanas genéticamente.



REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Lchthardt, C. (2012). Characterisation of different quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) accessions by GBS. Bachelor Thesis. Institute of Plant Breeding, Seed Science and Population Genetics. Universitat Hohenheim.Stuttgart, Alemania. 32 p.
- Mujica, A., M.Suquilanda, E.Chura, E. Ruiz, A.León, S. Cutipa y C. Ponce. (2013a). Metodología de hibridación en quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.). En: Producción orgánica de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.). Universidad Nacional del Altiplano, FINCAGRO. Puno, Perú. pp. 104-110.
- Mujica, A. C. Ponce, B. Haussmann, W. Schmidt, C. Lchthardt & Schmid, K. (2013b). Comparison of different crossing and selection strategies in the genetic improvement of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) varieties. In: International Quinoa Research Simposium. 12-14 august 2013.Washington State University, Pullman WA. USA.
- Elshire, R.J. *et al*, (2011). A Robust, simple Genotyping-by-Sequencing (GBS) Approach for high diversity species. PLoS One 6(5): e 19379.

Propagación vegetativa de rebrotes de café (*Coffea arabica*) con tres medios enraizamiento y Acido Indolbutírico

- Henry Ruiz Solsol¹, Geomar Vallejos Torres², Marco Antonio García Sánchez³, Luis Alberto Arévalo López⁴
- ¹ Ing. Agr. MSc. Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana. hruiz@catie.ac.cr
- ² Ing. Agr. Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana. gvallejost@iiap.org.pe
- ³ Ing. Agr. Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana. garciasanchezmarco@gmail.com
- ⁴ Ing. Agr. MSc. Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana. larevalol@iiap.org.pe

RESUMEN

Una alternativa para la propagación de plantas matrices de *Coffea arabica* a escala comercial con características de gran interés agronómico como la resistencia a roya, buena calidad de taza y alta productividad es la clonación por enraizamiento de rebrotes. El objetivo del estudio fue evaluar el efecto de tres de medios de enraizamiento (al aire, jiffy, arena media) y cuatro dosis de ácido indolbutírico (0,00; 0,05; 0,10 y 0,40%) sobre la capacidad de enraizamiento de rebrotes de *C. arabica* mediante cámaras de nebulización; a través de un diseño completamente al azar (DCA) con arreglo factorial 3 x 4, con 3 repeticiones y 5 estacas por unidad experimental. Al término de los 45 días se obtuvieron enraizamiento del 70% utilizando jiffy como medio de enraizamiento y dosis de ácido indolbutírico al 0,10%.

ABSTRACT

An alternative matrices for the propagation of *Coffea arabica* plants on a commercial scale with characteristics of great agronomic interest such as rust resistance, good quality and high productivity cup is cloning by rooting of shoots. The aim of the study was to evaluate the effect of three rooting media (air, jiffy, medium sand) and four doses of indole butyric acid (0,00; 0,05; 0,10 and 0,40%) on the rooting of shoots ability of *C. arabica* by spray chambers; through a completely randomized design (DCA) 3 x 4 factorial arrangement, with 3 replications and 5 cuttings per experimental unit. At the end of 45 days of 70% rooting were obtained using jiffy as rooting medium and indolebutyric acid dose 0,10%.

INTRODUCCIÓN

El café es uno de los productos agrícolas más importantes en el mundo. Es producido y exportado por más de cincuenta países en desarrollo de América Latina, África y Asia. El Perú es el tercer mayor productor de café de Sudamérica, detrás de Brasil y Colombia, exportando a 46 países, el 60% de los cuales se encuentra en Europa y es muy cotizado por su calidad de taza. Sin embargo en los dos últimos años, la cosecha de café cayó en un 18%, afectada por las secuelas del hongo de la roya y la plaga de broca, por lo que se busca materiales genéticos promisorios con tolerancia a roya como una estrategia de control a corto y mediano plazo, siendo la propagación vegetativa una de las estrategias viables.

Los cultivares de *C. arabica* son predominantemente autopolinizados y, consecuentemente, homocigotas y bastantes uniformes, razón por la cual son comúnmente propagados por semillas, sin embargo pueden alcanzar hasta un 20% de alogamia, no pudiendo preservar plantas heterocigóticas para locis génicos condicionantes a heterosis para producción de granos y de resistencia a un determinado patógeno (Bergo *et al.*, 2000). Jesús (2003) menciona que esta preservación es posible por medio de la clonación y puede ser por medio del enraizamiento de estacas. Asimismo, la clonación de café puede traer beneficios, como la posibilidad de seleccionar y producir plantas matrices con característica de gran interés agronómico que difícilmente serían reunidas en un cultivar heterocigota propagado por semillas, como por ejemplo la resistencia a roya del café, buena calidad de taza y alta productividad. En base a lo mencionado, la investigación tuvo como objetivo evaluar el efecto de tres medios de enraizamiento (al aire, jiffy, arena media) y cuatro dosis de ácido indolbutírico (0,00; 0,05; 0,10 y 0,40%) sobre la capacidad de enraizamiento de rebrotes de *C. arabica*, mediante cámaras de nebulización.

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo se realizó en el vivero de la empresa Reforesta Perú S.A.C, ubicado en el distrito de la Banda de Shilcayo, San Martín, Perú; el cual se encuentra a una altitud de 325 msnm; registra una temperatura y una precipitación promedio mensual de 25,44°C y 72,3 mm, respectivamente y una humedad relativa promedio mensual de 70,3% (IIAP 2014). El material vegetativo se obtuvo de 20 plantas de café (*Coffea arabica*) perteneciente a una colección de plantas matrices promisorias con características fenotípicas de tolerancia a roya, alta productividad y buena calidad de taza. Los brotes vigorosos de 15 cm de longitud fueron colectados en horas tempranas del día entre 05:30 h y 07:30 h con tijeras de podar desinfectadas con alcohol a 96% y trasladados al área de propagación en cajas térmicas en papel húmedo para evitar su deshidratación. Los rebrotes se procesaron en un solo día en un módulo bajo sombra y se prepararon con un corte oblicuo justo arriba de un nudo; de 2,4 mm diámetro y 8,0 cm de longitud, se podaron las hojas al 50% para dejar una superficie foliar aproximada de 50 cm². Estas fueron tratadas con 4 dosis de ácido indolbutírico (AIB): 0,00; 0,05; 0,10 y 0,40%. Las soluciones hormonales se prepararon con la disolución precisa de AIB químicamente puro, en alcohol a 96%, para obtener la concentración deseada. El AIB fue aplicado a la base de los rebrotes en 10 µL de solución a través de una micropipeta, para asegurar que todas recibieran igual cantidad. Los rebrotes sin tratamiento hormonal recibieron una cantidad similar de alcohol únicamente. Inmediatamente después de la aplicación, se procedió a evaporar el alcohol, sometiendo la base de los rebrotes a una corriente de aire frío durante un minuto. Los rebrotes se colocaron en los medios de enraizamientos (al aire¹, jiffy² y arena media³) dentro de las cámaras húmedas. Se realizaron inspecciones cada 2 días para detectar y corregir problemas sanitarios, eliminar hojas caídas o estaquillas con síntomas de necrosis que pudieran ser foco de infección. Se utilizó un diseño completamente al azar con arreglo factorial 3x4 (3 medios de enraizamiento x 3 dosis de AIB) con 3 repeticiones y 5 rebrotes por unidad experimental, que generó 15 rebrotes para obtener el promedio de cada combinación de tratamientos. Los datos fueron analizados mediante los modelos lineales generales y mixtos y sometidos a la prueba de LSD Fisher (p<0.05) para determinar la naturaleza de las diferencias entre tratamientos, para realizar los análisis se utilizó el programa estadístico InfoStat (Di Rienzo *et al.*, 2014).

¹Siembra de estacas en bandejas al aire libre, es decir sin la presencia de sustratos.

²Recipientes de turba han sido elaborados con musgo de turba y fibras de madera.

³Material de cantera de 0,2 a 1,0 mm de diámetro.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto de los medios de enraizamiento

Las pruebas de hipótesis marginales (Tabla 1) para medios de enraizamiento mostraron diferencias estadísticas para las tres variables evaluadas (porcentaje de enraizamiento, número de raíces y longitud de raíces), asimismo para dosis de AIB y la interacción (medios de enraizamiento x dosis de AIB) no mostraron diferencias estadísticas.

La prueba LSD Fisher (tabla 2) mostró que el mayor porcentaje de enraizamiento, número de raíces y longitud de raíz se obtuvo con Jiffy como medio de enraizamiento (70%, 2,0 raíces y 1,26cm respectivamente. Estos resultados están asociados a que el jiffy tiene una buena porosidad como medio de enraizamiento que permite un buen intercambio gaseoso de las raíces además que mantiene un buen nivel de humedad. Sánchez *et al.*, (2010), menciona que el jiffy permite un mejor contacto del sistema radicular con el aire, el cual induce a una mejor crecimiento y beneficia la estructura radical de la especie *Pinus radiata*.

Tabla 1. Prueba de hipótesis marginales para evaluar el efecto de medios de enraizamiento y dosis de ácido indolbutírico variables relacionados con el enraizamiento de rebrotes de *Coffea arabica* evaluadas a los 40 días.

Fuente de variación	gl	Enraizamiento (%)		Raíces N°		Longitud raíz (cm)	
A (Medios de enraizamiento)	2	<0,0001	s	0,001	s	0,000	s
B (Dosis de AIB)	3	0,166	ns	0,524	ns	0,846	ns
AxB	6	0,053	ns	0,387	ns	0,944	ns

Tabla 2. Prueba de rango múltiple LSD Fisher por medio de enraizamiento para las variables relacionadas con la capacidad de enraizamiento de rebrotes de *Coffea arabica*.

Medios de enraizamiento	Enraizamiento (%)		Raíces N°		Longitud raíz (cm)	
Al aire	16,51%	b	0,13	b	0,09	b
Jiffy	70,00%	a	2,10	a	1,26	a
Arena media	24,17%	b	0,17	b	0,05	b

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Efectos de la dosis de AIB

A pesar de no existir diferencias estadísticas según las pruebas de hipótesis marginales (tabla 1), se pudo observar diferencias numéricas y el afecto aplicando dosis de AIB al 0.10% mostrando un mayor porcentaje de enraizamiento (36,11%), seguido de las dosis 0,05% y 0,40% (porcentaje de enraizamiento de 10,00% y 15,56%, respectivamente). Es importante mencionar que al aplicar AIB aumenta el porcentaje de enraizamiento. Este patrón de respuesta ha sido encontrado en gran cantidad de otras especies (Blazich 1988, Hartmann y Kester 1996, Mesén 1993), donde normalmente se da un aumento en la capacidad de enraizamiento al aumentar la dosis de auxina hasta alcanzar un óptimo, a partir del cual cualquier aumento en dosis de auxina resulta en una disminución en el enraizamiento debido a los efectos tóxicos de la sobredosis. Los efectos positivos de las auxinas en el enraizamiento han sido asociados a sus efectos sobre la división celular, el aumento de transporte de carbohidratos y otros cofactores foliares a los sitios de aplicación, así como a la estimulación en la síntesis de ADN en las células tratadas (Mesén *et al.*, 1996).

Para el número promedio de raíces y longitud de raíces mostró la típica tendencia creciente al aumentar la dosis de AIB, como se ha observado en muchas otras especies tropicales (Mesén 1993, Mesén *et al.* 1996). El número de raíces producido por las estaquillas es altamente influenciado por la habilidad de la estaca a suplir carbohidratos, ya sea de reserva o producido mediante fotosíntesis, al área donde surgen las raíces (Lovell y White 1986, Moe y Andersen 1988, Veierskov y Andersen 1982). Por lo tanto, una vez que la estaquilla enraíza, las dosis crecientes de AIB, mediante sus reconocidos efectos sobre la división celular y el transporte de sustancias hacia la base de la estaquilla, permiten el desarrollo de un mayor número de raíces, como se presentó en el presente estudio.

BIBLIOGRAFÍA

- Bergo, C. L.; Mendes, A. N. G. 2000. Propagação vegetativa do cafeeiro (*Coffea arabica* L.) por meio do enraizamento de estacas 24:392 – 398.
- Blazich F.A. 1988. Chemicals and formulations used to promote adventitious rooting, pp. 132-149. In: T.D. Davis, B.E. Haissig and N. Sankhla (eds). Adventitious Root Formation in Cuttings. B.E. Dioscorides Press, EE. UU.
- Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C.W. InfoStat versión 2014. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Hartmann T., Kester E. 1996. Propagación de plantas: principios y prácticas. Editorial Continental S.A. México. 814 p.
- IIAP. 2013. Estación Meteorológica: Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana, San Martín, Banda de Shilcayo, San Martín, Perú.
- Jesús, A. M. S. 2003. Propagação vegetativa do cafeeiro (*Coffea arabica* L.). Tese doutorado em fitotecnia, Universidade Federal de Lavras, Lavras. 137 p.

- Lovell P.H., White J. 1986. Anatomical changes during adventitious root formation, pp. 111-140. In: M.B. Lackson (ed). New root formation in plants and cuttings. Martinus Nijhoff Publisher, Dordrecht.
- Mesén F. 1993. Vegetative propagation of Central American hardwoods. Thesis Ph.D. University of Edinburgh, Scotland. 231 p.
- Mesén F., Leakey R.R.B., Newton A. 1996. Propagadores de subirrigación: un sistema simple y económico para la propagación vegetativa de especies forestales, pp. 101-110. In: R. Salazar (ed). Avances en la producción de semillas forestales en América Latina. CATIE.
- Moe R., Andersen A.S. 1988. Stockplant environment and subsequent adventitious rooting, pp. 214- 234. In: T.D. Davis, B.E. Haissig and N. Sankhla (eds). Adventitious Root Formation in Cuttings. Dioscorides Press, EE. UU.
- Sánchez J., Ortega U., Majada, J.,Txarterina K., y Duñabeitia, M. 2008. Optimización de la propagación vegetativa por estaquillado de genotipos de interés comercial de *Pinus radiata*. Sociedad Española de ciencias forestales 28:201-205.
- Veierskov B., Andersen A.S. 1982. Dynamics of extractable carbohydrates in *Pisumsativum*. III. The effect of IAA and temperature on content and translocation of carbohydrates in pea cuttings during rooting. *Physiologia Plantarum* 55:179-182.

Cuatro modalidades de microinjerto y tres auxinas (ANA, AIA, AIB) en el manejo invitro de plantas de limonero (*Citrus aurantifolia* Christm.) y naranjo (*Citrus sinensis* L.)

Froy Engelbert Coloma Dongo¹

Docente de la Universidad Católica de Santa María Programa profesional de Ingeniería Agronómica

RESUMEN

La investigación se realizó en laboratorio de cultivo de tejidos vegetales *in vitro* fundo "La Católica" de la UCSM con el fin de evaluar la respuesta de cuatro modalidades de microinjerto (hendidura, escisión, T invertida y T normal) con tres auxinas (ANA 10 ppm, AIA 25 ppm, AIB 50 ppm) y cuatro tiempos de inmersión de los ápices meristemáticos a injertar (5, 15,30 y 60 minutos) en las soluciones de auxinas. Después de 30 días se procedió a su evaluación encontrándose que el microinjerto en hendidura presento un prendimiento de 60% para limonero y 66% para naranjo. En el efecto de las auxinas se observo que el AIB con un tiempo de inmersión de 15 minutos logro 92% para limonero y 96% para naranjo. En aclimatación las plantas tratadas con AIB y 15 minutos de inmersión alcanzaron a los 30 días 53.8% y 57,14% de sobrevivencia para limonero y naranjo.

ABSTRACT: The research was conducted in laboratory of plant tissue culture *in vitro* founded "La Catolica" of the UCSM in order to assess the response of four forms of micrografting (slit, excision, inverted T and T normal) with three auxins (NAA 10 ppm, IAA 25 ppm, IBA 50 ppm) and four dive times of the apices meristematic graft (5, 15.30 and 60 minutes) in the solutions of auxins. After 30 days will be proceeded to its evaluation found that the micrograft slit introduced a apprehension of 60% for lemon and 66% for Naranjo. In the effect of auxins it was observed that the IBA with a dive time of 15 minutes achieving 92% for lemon and 96% for Naranjo. Acclimation in plants treated with IBA and 15 minutes of immersion reached 30 days 53.8 % and 57.14 % of survival for lemon and orange.

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades de los cítricos producidas por virus, viroides, micoplasmas y otros organismos similares (en general llamados virus) producen importantísimas pérdidas económicas en todo el mundo. Algunas enfermedades provocan la muerte comercial de los árboles y otras la disminución de la producción del 20 al 30%, baja calidad del fruto, pérdida de vigor y longevidad de los árboles (Monteverde, 1994).

Estas enfermedades están muy extendidas debido a la propagación vegetativa del material infectado y a la práctica del injerto. Es normal encontrar varios tipos de virosis en el mismo árbol y en muchos países como Colombia, prácticamente el 95% de los árboles de las plantaciones están afectadas por alguna virosis (Peñaranda, 1993).

Frente a ello fue desarrollada la técnica del microinjerto que permite generar plantas libres de patógenos mediante la producción de plantas microinjertadas *in vitro*, en la que se ha podido observar que presenta algunas dificultades, como el bajo prendimiento de los microinjertos, como en el caso del duraznero y naranjo que permiten entre el 20 y 30% (Mosella y Ascui, 1993).

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIAL VEGETAL: Limón sutil (*Citrus aurantifolia*) que será microinjertado en limón rugoso (*Citrus jambhiri*), y naranja dulce (*Citrus sinensis*) que será microinjertada en mandarina Cleopatra (*Citrus reshii*).

METODOLOGÍA Los portainjertos ya desarrollados, fueron extraídos de sus recipientes, se les eliminó el epicótilo a 2 cm del cuello de la plántula y los cotiledones, también fue eliminada la parte final de la raíz, dejando un trozo de dos centímetros aproximadamente (Navarro, 1979). Esta operación se realizó sobre una placa petri que contenía hojas de papel filtro que fueron previamente autoclavadas a 121°C durante 30 minutos. El ápice "injerto" aislado con un bisturí se colocó sobre la superficie decapitada del patrón, este procedimiento de preparación del patrón y el aislamiento del ápice se llevó a cabo asépticamente y con un estereoscopio (Navarro, 1979).

RESULTADOS Y DISCUSION

Respuesta de los ápices meristemáticos a las cuatro modalidades de microinjerto : Con la aplicación de ANA, se puede distinguir que en limonero solo se tuvo éxito cuando se procedió a colocar los ápices injerto en ANA por un tiempo de 15 minutos, mientras que en naranjo con 15, 30 y 60 minutos se tuvo microinjertos prendidos en porcentajes que están muy por debajo de los testigos que presentaron 60% y 66% de microinjertos prendidos en limonero y naranjo respectivamente lo cual probablemente sea debido a que el ANA es excelente en la promoción de raíces pero puede provocar daño en las plantas por concentraciones excesivas (Weaver, 1976), lo que nos hace suponer que la concentración de ANA (53,70 uM); usada comúnmente a fin de incrementar el porcentaje de prendimiento de injertos en vid (Weaver, 1976), podría ser demasiado alta para tratar tejidos jóvenes y de pequeño tamaño como los del ápice injerto (Carvalho et al., 1998), por tiempos mayores a 15 minutos, razón por la cual estaría causando a su vez que los ápices microinjertados se mantengan vivos pero sin ningún crecimiento después de los 30 días.

RESPUESTA EN PORCENTAJE (%) DE LOS MICROINJERTOS EN HENDIDURA A LA APLICACIÓN DE ANA (53,70 μ M) A LOS 30 DÍAS DE EVALUACIÓN

TIEMPO EN MINUTOS	LIMONERO				NARANJO			
	PRENDIDOS	VIVOS SIN D.	CON CALLO	NO VIABLES	PRENDIDOS	VIVOS SIN D.	CON CALLO	NO VIABLES
0	60	28	12	0	66	22	12	0
5	0	100	0	0	0	100	0	0
15	20	80	0	0	24	76	0	0
30	0	100	0	0	20	80	0	0
60	0	100	0	0	20	80	0	0

Con la aplicación de AIA , podemos ver que, el AIA no influyó positivamente en el aumento del porcentaje de microinjertos prendidos, en comparación con el tratamiento testigo, ni en limonero ni en naranjo; esto probablemente se deba a que una de las dificultades para experimentar con AIA es que la auxina adicionada es inactivada muy rápidamente en la mayoría de tejidos y a menudo es muy difícil mantener concentraciones más altas de lo natural en los tejidos experimentalmente (Bidwell, 1993).

RESPUESTA EN PORCENTAJE (%) DE LOS MICROINJERTOS EN HENDIDURA A LA APLICACIÓN DE AIA (142,70 μ M) A LOS 30 DÍAS DE EVALUACIÓN

TIEMPO EN MINUTOS	LIMONERO c.v.= 8,2				NARANJO c.v.= 7,8			
	PRENDIDOS	VIVOS SIN D.	CON CALLO	NO VIABLES	PRENDIDOS	VIVOS SIN D.	CON CALLO	NO VIABLES
0	60 \pm 0 a	28	12	0	66 \pm 5,4 a	22	12	0
5	56 \pm 8,9 a	24	20	0	56 \pm 8,9 ab	24	20	0
15	60 \pm 0 a	20	20	0	60 \pm 0 a	20	20	0
30	56 \pm 8,9 a	24	20	0	60 \pm 0 a	20	20	0
60	64 \pm 8,9 a	16	20	0	52 \pm 10,9 b	20	20	8

* Letras diferentes indican que existe diferencia estadística significativa (Tukey p<0.05)

* Los valores son promedios \pm la desviación estándar de 25 réplicas

Con la aplicación de AIB, podemos observar que el AIB influyó positivamente en el incremento del porcentaje de microinjertos prendidos, con relación a los resultados obtenidos en el tratamiento testigo, tanto en limonero como en naranjo. Esta respuesta obtenida es probablemente a causa de que el AIB tiene una actividad auxínica débil y los sistemas de enzimas destructoras de auxinas la destruyen en forma relativamente lenta, se desplaza muy poco, se retiene cerca del sitio de aplicación. Mientras que las auxinas que se desplazan con facilidad pueden causar efectos indeseables de crecimiento en la planta propagada (Weaver, 1976).

RESPUESTA EN PORCENTAJE (%) DE LOS MICROINJERTOS EN HENDIDURA A LA APLICACIÓN DE AIB EN

LIMONERO Y NARANJO A LOS 30 DÍAS DE EVALUACIÓN

TIEMPO. EN MINUTOS	LIMONERO c.v.= 10,9				NARANJO c.v. = 9,8			
	PRENDIDOS	VIVOS SIN D.	CON CALLO	NO VIABLES	PRENDIDOS	VIVOS SIN D.	CON CALLO	NO VIABLES
0	60 ± 0 c	28	12	0	66 ± 5,4 b	22	12	0
5	60 ± 0 c	40	0	0	68 ± 10,9 b	28	0	4
15	92 ± 10,9 a	8	0	0	96 ± 8,9 a	4	0	0
30	80 ± 0 b	20	0	0	80 ± 0 b	20	0	0
60	80 ± 0 b	20	0	0	80 ± 0 b	20	0	0

* Letras diferentes indican que existe diferencia estadística significativa (Tukey p<0.05)

* Los valores son promedios ± la desviación estándar de 25 réplicas

Respuesta a la aclimatación de las plantas microinjertadas de limón sutil sobre limón rugoso y naranja dulce sobre mandarina Cleopatra en condiciones de invernadero. El porcentaje más alto lo tuvo el tratamiento de 15 minutos con 57,1%, resultados superiores a los mencionados por Mosella y Ascui (1993), quienes reportan que reduciendo el estrés de la plántula, lograron aumentar a 32% el éxito del trasplante a macetas de los microinjertos de naranja Thomson sobre citrange Troyer, y similares a los obtenidos por Déogratias et al. (1986), en microinjertos de *Prunus avium* y *Prunus persica* con plantas jóvenes, quien obtuvo 50% de sobrevivencia de las plántulas, pero inferiores a los resultados reportados por Navarro (1979) quien menciona un 95% de sobrevivencia en diversos cítricos y por Starrantino (1992) que obtuvo 63% de sobrevivencia en plántulas microinjertadas de naranja dulce, limón y clementinas..

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **BIDWELL, R.** 1993. Fisiología Vegetal, AGT Editor, S.A México.
2. **CANGAHUALA, G., y QUIÑÓNEZ, M.** 2000. Determinación del patrón más adecuado para el microinjerto *in vitro* de naranja var. Washington navel, Universidad Nacional de San Marcos.
3. **DEGRATIAS, J., LUTS, A. y DOSBA, F.** 1996. *In vitro* micrografting of shoot tips from juvenile and adult *Prunus avium* L. And *Prunus persica* L. batsch to produce virus-free plants. Acta Hort. (ISHS), 193, 139 – 146.
4. **MONTEVERDE, E., GARCIA, M., y BRICEÑO, M.** 2000. Obtención de plantas cítricas libres de psorosis y exocortosis en árboles infectados a través de la microinjertación de ápices *in vitro*. Agronomía Tropical, 36, 5 – 14.
5. **MOSELLA, CH., y ASCUI, M.** 1993. Frutales libres de virus partiendo de ápices meristemáticos cultivados *in vitro*. En cultivo de tejidos en la agricultura fundamentos y aplicaciones. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Roca W. y Mroginski L. (Eds.) Cali – Colombia. pp.513 - 532.
6. **NAVARRO, L.** 1979. Microinjerto de ápices caulinares *in vitro* para la obtención de plantas de agrios libres de virus. Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias, Centro de Levante Moncada (Valencia). Bol. Serv. Plagas, 5, 127 – 148. Roma 14 – 15 febrario.
7. **STARRANTINO, A.** 1992. Il Microinnesto *in vitro* degli Agrumi, Istituto Sperimentales per l' Agrumicoltura. Petria 2 (Supli.1), 27 – 35..
8. **VILELA, L., ALVES, S., y DE SOUZA, M.** 1993. Limpeza clonal da laranjeira “Seleta folha murcha” a través da microenxertia *in vitro*. Pesquisa Agropecuaria Brasileira, 28, 1341 – 1344.
9. **WEAVER, R.** 1976. Reguladores del Crecimiento de las Plantas en la Agricultura, Editorial Trillas, México.

Multiplicación de plántulas de piña (*Ananas comosus* L. Merr.) en sistemas de inmersión temporal y aclimatación bajo condiciones de Chanchamayo para su escalamiento.

Henry Juárez¹, María San Martín², Lourdes Tapia y Figueroa² y Jorge Tenorio³

¹Asociación de Productores de Frutas Premium de la Selva Central / EcoSolution SAC

Email: henryjuarezsoto@gmail.com

²Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Agraria La Molina. Av. La Molina s/n. La Molina, Lima.

³AgroSanidad SAC.

RESUMEN

La aplicación del Sistema de Inmersión Temporal (SIT) en Biorreactores tiene potencialidad de mejorar la eficiencia de micro propagación en el cultivo de piña. Sin embargo, el éxito de la implementación y desarrollo de la técnica exige la formulación de protocolos precisos para cada variedad. El presente estudio tuvo como objetivos: i) evaluar la respuesta de tres variedades de piña (“Samba de Chanchamayo”, “Cayena Lisa” y “MD2”) a la propagación con SIT en biorreactores, ii) evaluar diferentes medios de cultivo para la propagación de la variedad MD2 con el SIT en biorreactores, y iii) evaluar la respuesta a la aclimatación plántulas MD2 bajo condiciones de Chanchamayo. Los resultados muestran que la variedad MD2 tiene la mayor factibilidad de ser propagada por el SIT en biorreactores alcanzando tasas de multiplicación de 18.8 en comparación con Cayena Lisa (10.2) o Samba de Chanchamayo (6.0). Adicionalmente, no se encontraron diferencias significativas en la aclimatación y endurecimiento de plántulas de MD2 bajo condiciones de Chanchamayo entre los tratamientos, lo que muestra la facilidad de introducirlos para campo definitivo. Esta investigación muestra la factibilidad de mejorar la eficiencia de micro propagación y a la aclimatación en la variedad de piña MD2. Esta herramienta constituye una innovación principalmente para el sector dedicado a la multiplicación de plántulas, ya que su implementación puede permitir el escalamiento y masificación de esta variedad.

ABSTRACT

New technologies to improve conventional micro propagation need the development of alternative methods such as Temporal Immersion Systems (SIT) in bioreactors. SIT has the potential to improve the efficiency of pineapple micro propagation. However, the success of the technology requires the development of protocols adapted for each variety. For this reason, the objective of this research were: i) to evaluate the response of three pineapple varieties (“Samba de Chanchamayo”, “Cayena Lisa” y “MD2”) to in vitro propagation using SIT, ii) to evaluate the response of the variety MD2 to different tissue culture for in vitro propagation using SIT, and iii) to evaluate the effect of acclimatization of plants in the field. Results show the MD2 variety has the greatest feasibility to be propagated with SIT in bioreactors. The multiplication rate of MD2 was 18.8 and higher than Cayena Lisa (10.2), and Samba de Chanchamayo (6.0). Additionally, no significant differences in acclimation and hardening of M2D seedlings under conditions of Chanchamayo were found. Results show the feasibility to introduce the seedlings in the farmer fields and the viability to improve the efficiency of micro propagation and scaling up the adoption of this new variety.

INTRODUCCIÓN

En el ámbito mundial, la variedad de piña más difundida es la Cayena Lisa. Sin embargo, los avances en biotecnología han permitido generar la variedad MD2 conocida con los nombres “Golden”, “Hawaiian Gold”, o “Del Monte Gold Extra SweetPineapple”. Esta variedad tiene una expansión en el mercado mundial desde mediados de los 90’s, alcanzando un valor de comercialización superior a los US\$1,546 millones para el 2007. Las técnicas de micro propagación son muy útiles para la multiplicación de nuevas variedades. Sin embargo, las metodologías existentes como la micro propagación convencional (Daquinta & Benegas, 1997) demandan mucho trabajo y requieren grandes espacios en laboratorio. Consecuentemente, los costos de producción de las plántulas son muy altos. La necesidad de encontrar nuevas metodologías que permitan superar las limitaciones que presenta la micro propagación convencional ha implicado el desarrollo de métodos alternativos como el Sistema de Inmersión Temporal (SIT) en biorreactores (Escalona *et al.*, 1999; Escalona *et al.*, 2003; Escalona, 2006). Este sistema incorpora las ventajas del uso del medio líquido y diferentes grados de automatización al proceso de propagación in vitro con el objetivo de reducir los costos de producción de plantas.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó en el Laboratorio de Cultivos de Tejidos del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Agraria La Molina. Los meristemas se obtuvieron a partir de las yemas de la corona de la fruta de piña madura. La corona se lavó con detergente comercial y se enjuagaron 3 veces con agua. En la cámara de flujo laminar se extrajeron las yemas de la corona en forma de triángulo. Las yemas se colocaron en Hipoclorito de Sodio (NaClO) al 2.62% durante 1 minuto. Luego se enjuagaron tres veces en agua destilada estéril. Las yemas se sembraron sobre medio líquido con soporte de papel filtro las cuales fueron incubadas a 25°C durante 4 meses. Posteriormente fueron transferidas a medio semisólido. Las plántulas en fase de multiplicación fueron sub cultivadas cuatro veces en frascos de vidrio estériles (7 cm de alto, 6 cm de diámetro) que contenían 25 ml de medio de cultivo. Las plántulas se incubaron a 25 grados centígrados con foto periodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad, y con luminosidad de 200 lux (Daquinta *et al.*, 1997).

Las plántulas de la fase de multiplicación fueron utilizadas para la siembra en el SIT en biorreactores. Los frascos, tapas, filtros y tubos de silicona fueron lavados con detergente comercial, desinfectados con Hipoclorito de Sodio (NaClO) al 2.62% y enjuagados con agua estéril. Se utilizaron frascos de vidrio transparente de 4000 ml (44 cm de diámetro y 26 cm de altura). Todos los materiales fue autoclavados durante 20 minutos a 121 grados centígrados a 15 psi de presión. En los ensayos 1 y 2 se utilizaron 30 explantes por repetición. Cada explante estaba constituido por brotes de dos a tres centímetros, y dos brotes axilares de uno a dos centímetros. Los explantes fueron sembrados en un frasco vacío estéril, y en el otro frasco se colocó el medio de cultivo líquido. Ambos frascos fueron sellados herméticamente con tapas y se utilizó una inmersión de cinco minutos en intervalos de tres horas (Escalona *et al.*, 1999).

Ensayo 1. Se utilizaron las variedades “Samba de Chanchamayo”, “Cayena Lisa” y “MD2” para evaluar su respuesta a los SIT en biorreactores en un medio de cultivo convencional en la propagación in vitro. Se utilizó el medio de cultivo con sales de Murashige y Skoog (Murashige & Skoog 1962), 2.1 mg/L Bencil-adenina, 0.3 mg/L Acido naftalenacético. El pH fue ajustado a 5.7. Para este ensayo se utilizaron tres repeticiones para cada tratamiento. En cada repetición se utilizaron 30 explantes.

Ensayo 2. Para evaluar la respuesta de diferentes medios de cultivo en la propagación in vitro bajo SIT en biorreactores se utilizó la variedad MD2. Se utilizaron cinco repeticiones para cada tratamiento. En cada repetición se utilizó 30 explantes. El pH para todos los tratamientos fue ajustado a 5.7. Los medios de cultivo evaluados con sustitución de sales minerales y vitaminas para cada tratamiento.

A los sesenta días de la siembra se cosecharon las plántulas de cada frasco del SIT para evaluar: i) altura de plántula entera (cm), ii) número de hojas por plántula, y iii) número de plántulas totales por frasco del SIT para obtener la tasa de multiplicación para los ensayos 1 y 2.

Ensayo 3. Se usaron tres tipos de sustrato para evaluar la respuesta de la aclimatación de plántulas in vitro de piña MD2 en diferentes sustratos bajo condiciones de San Ramón. Los sustratos fueron i) turba de Peat Moss, ii) sustrato Premix #3, y iii) sustrato PeatMoss + Perlita. La siembra se realizó en la localidad de San Ramón, Chanchamayo en bandejas plásticas de 128 alvéolos y fueron dispuestas bajo protección de malla Rachell negra de 60% de cobertura. Se evaluó la emergencia a los 14 días después de la siembra y tamaño de planta a los 60 días.

Para los 3 ensayos se utilizó el diseño completamente al azar y la comparación de medias se realizó mediante la prueba de Tukey con un nivel de significación de $\alpha=0.05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados muestran que la variedad MD2 tiene la mayor factibilidad de ser propagada por los SIT en biorreactores alcanzando tasas de multiplicación (18.8) en comparación con la Cayena Lisa (10.2) o la Samba de Chanchamayo (6.0). Adicionalmente, la mayor tasa de multiplicación y tamaño de plántula en la variedad MD2 puede lograrse indistintamente con el tratamiento B0 (Sales de Murashige y Skoog, vitaminas MS, 100 mg/L myo-inositol y 30 g/L de sacarosa) o B1 (Sales de Murashige y Skoog, vitaminas MS, 100 mg/L de myo-inositol, 2.1 mg/L Bencil amino Purina, 0.3 mg/L ácido naftalenacético y 30 g/L de sacarosa). Adicionalmente, no se encontraron diferencias significativas en la aclimatación y endurecimiento de plántulas de MD2 bajo condiciones de Chanchamayo entre los tratamientos, lo que muestra la facilidad de introducirlos para campo definitivo. Esta investigación muestra la factibilidad de mejorar la eficiencia de micro propagación y a la aclimatación en la variedad de piña MD2. Esta herramienta constituye una innovación principalmente para el sector dedicado a la multiplicación de plántulas, ya que su implementación puede permitir el escalamiento y masificación de esta variedad. Sin embargo, el éxito en la implementación y desarrollo de la técnica exige la formulación de protocolos de propagación para cada especie y variedad que se quiera propagar y aclimatar.

AGRADECIMIENTOS

El proyecto fue financiado por el Fondo de Innovación en Ciencia y Tecnología – FInCyT (Contrato PITEA-173) y se desarrolló en conjunto entre AgroConsulting SAC, EcoSolution SAC, Laboratorios Analíticos del Sur EIRL, el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Agraria La Molina, con la posterior incorporación de la Asociación de Productores de Frutas Premium de la Selva Central. El proyecto fue desarrollado entre 2010 y 2012.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- Daquinta M. & Benegas R. 1997. Brief review of tissue culture of pineapple. *Pineapple Newsl.* 3:7-9.
- Escalona M. 2006. Temporary immersion beats traditional techniques on all fronts. *Prophytaannual:* 48-50.
- Escalona M., Lorenzo J., Gonzalez B., Daquinta M., Borroto C., Gonzalez J. & Desjardins Y. 1999. Pineapple micro propagation in temporary immersion systems: *Plant Cell rep.* 18:743-748.
- Escalona M., Samaon G., Borroto C. & Desjardins Y. 2003. Physiology of effects of temporary immersion bioreactors on micro propagated pineapple plantlets. *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 39: 651-656.
- Murashige T. & Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiología Plantarum*, 15:473-497.

Avances de caracterización morfológica y molecular de mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pavón) de los departamentos de Cusco y Cajamarca, Perú

Erika Pacheco¹, Joel Flores¹, Daniel Huaman¹, Raul Blas¹, Eduardo Jovel & Andrew Riseman²

¹Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Agraria La Molina, ²University of British Columbia, Canadá
sami_7070_7@hotmail.com, rblas@lamolina.edu.pe

Resumen.

Con el objetivo de conocer la diversidad de la mashua, se caracterizaron un total de 253 accesiones procedentes de Cajamarca y Cusco, usando herramientas morfológicas y moleculares. En la caracterización morfológica se utilizaron 44 descriptores y al presente se han identificado 219 morfotipos, de ellas 200 son de Cusco y 19 de Cajamarca. Mientras que, la caracterización molecular muestra al momento 58% de polimorfismo, lo que ayudará definir mejor los morfotipos.

Progress on morphological and molecular characterization of mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pavón) from Cajamarca and Cuzco Departments, Peru.

Abstract.

To document the diversity of mashua germplasm, a total of 253 accessions from Cajamarca and Cusco regions were collected and characterized using morphological and molecular tools. For the morphological characterization, we used 44 descriptors that permitted us to identify 219 unique morphotypes, with 200 from Cuzco and 19 from Cajamarca. The molecular characterization, at present, shows 58% polymorphism, and when combined with the morphological data, will further help define Peruvian mashua diversity.

INTRODUCCIÓN

La mashua es un miembro de la familia de las Tropaeolaceae (Grau et al., 2003). A su vez, esta especie se divide en dos subespecies, las cuales se diferencian por la presencia y ausencia de tubérculo. La ssp. *tuberosum* es la más conocida y cultivada por tubérculos comestibles, mientras que de la ssp. *silvestre* solo se tiene apuntes escasos de sus características en campo.

La mashua es el cuarto tubérculo más importante después de la papa, oca y olluco. Esta presenta atributos positivos de interés agronómico como su rusticidad, tolerancia a plagas y su alta productividad con bajos niveles de insumos, además posee una amplia gama de fitoquímicos que no solo protegen al mismo cultivo, sino también contra las plagas de otros cultivos (Grau et al., 2003). Sin embargo, a pesar de sus propiedades nutricionales y medicinales, no compensa la baja demanda del mercado, baja rentabilidad, poca disponibilidad de tierra cultivable, y la preferencia por otras especies; razón por la cual ha sufrido una reducción en su consumo (Grau et al., 2003; Pissard et al., 2008). La variación genética de la mashua ha sido descrita principalmente en términos de características morfológicas y agronómicas, sin embargo en los últimos años se ha determinado la variación molecular mediante el uso de marcadores moleculares: SRP (Ortega et al., 2007), AFLP (Alagón y Rosas, 2008) y ISSR (Pissard et al., 2008 y Malice et al., 2010). Sin embargo se recomienda que para la conservación de colecciones se asocie la diversidad morfológica y la diversidad molecular. Es por ello que se propone el uso de marcadores moleculares y morfológicos en el análisis de diversidad, porque ambos nos proporcionan una información complementaria, lo cual nos permitirá obtener un análisis de la diversidad genética más completo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material Vegetal: Las plantas fueron obtenidas de la colección 2011-2012 del Proyecto AGROECO-UNALM de las comunidades campesinas del Cusco y de Cajamarca. La colección consta de 254 accesiones del Cusco y 20 accesiones de Cajamarca.

Caracterización de germoplasma:

Caracterización morfológica: las accesiones fueron sembradas en parcelas demostrativas en terreno de la comunidad de Huancoco Pillpinto, en la provincia de Calca, Cusco y en el caserío de Carbón Alto, provincia de San Marcos, Cajamarca. Se emplearon 44 descriptores morfológicos para la caracterización.

La caracterización molecular: la extracción del ADN fue realizada mediante el método de CTAB (Doyle y Doyle, 1990), luego fue empleado la técnica de AFLP (Polimorfismo longitudinal de fragmentos amplificados) según el procedimiento desarrollado por Vos et al. (1995).

Análisis estadístico

Los datos morfológicos han sido analizados usando herramientas de estadística univariada (frecuencia y moda) y análisis multivariado (correspondencia múltiple y agrupamientos), usando los paquete NTSYS versión 2.2 (Rohlf, 2001) y R version 3.1.0. Los datos moleculares serán analizados mediante los cálculos de polimorfismos, heterocigosidad, AMOVA y agrupamientos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización morfológica

En Cusco a nivel de follaje, se puede ver que la mayoría de las plantas son del tipo semiprostrada y prostrada, lo cual representa al 47.13% y 37.30%. En cuanto las características de la flor se puede notar que el color de la corola es amarillo con naranja (69.01 y 57.02), el cáliz es rojo naranja (62.81). La forma del tubérculo generalmente es cilíndrica y cónica alargada (35,57 y 22,92%). El color predominante de la piel del tubérculo generalmente es amarillo oscuro (67,98%), mientras que el color secundario esta mayormente

ausente; sin embargo el color secundario que generalmente se presenta es el púrpura rojizo (21,74%) y se encuentra distribuido en los ojos y en el ápice (30,04%) en forma de jaspes, bandas y manchas (32,81%). En la figura 1 se observa algunas variantes del color de la piel del tubérculo.

En Cajamarca se puede ver que el follaje generalmente es del tipo semipostrada y postrada, lo cual representa al 30% y 60% respectivamente. En las características de la flor se puede notar que el color de la corola es amarillo oscuro con naranja rojizo (72 y 94.44%), el cáliz es rojo oscuro. La forma del tubérculo es generalmente cónica alargada y cilíndrica (35 y 30%). El color predominante de la piel del tubérculo generalmente es amarillo oscuro (55%), mientras que el color secundario generalmente es morado (30%) y generalmente se encuentra distribuido hacia el ápice (25%) e igualmente distribuido (45%).



Figura 1: Variabilidad del color de la piel encontrados en las accesiones de Cusco.

El análisis de correspondencia múltiple acumulo en 8 dimensiones el 66,1% de la varianza total. Las dos primeras dimensiones brindaron un aporte de 40%. Los caracteres que tienen un mayor peso son los de caracteres de tubérculo. Según la prueba de χ^2 de distancias los 5 caracteres más discriminantes son: el color secundario de la piel, distribución del color secundario de la pulpa, distribución del color secundario de la piel, la forma de coloración secundaria de la piel, y el número de estigmas. En la figura 2 se observa el dendrograma obtenido de la evaluación morfológica de Cajamarca en la que se observa que de las 20 accesiones 2 de ellas son clones, pasando a ser 19 morfotipos.

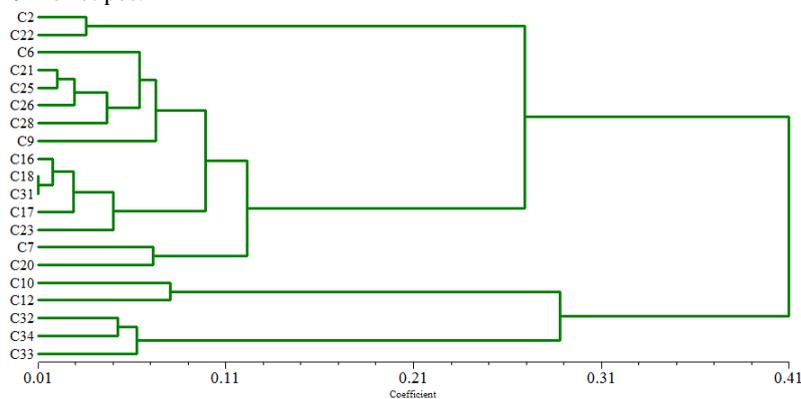


Figura 2: Dendrograma que agrupa 20 entradas de mahua de Cajamarca con los 44 características morfológicas.

En la caracterización molecular, se ha avanzado hasta el momento con tres pares de combinaciones de iniciadores: E-AC/M-AGC (E32 M40), E-AAC/M-AGG (E32 M41) y E-/M- (E32 M59). Las tres combinaciones generaron un total de 178 bandas amplificadas de las cuales 105 son polimórficas, obteniéndose así un total de 58% de polimorfismo.

En la figura 3 se observa un producto de la amplificación obtenida con la combinación de un par de iniciadores E 32 M 59.

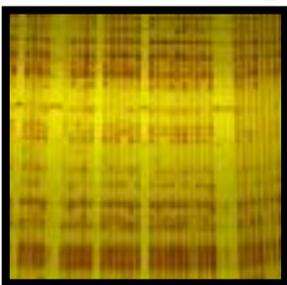


Figura 2: Producto de la amplificación de 48 individuos de la combinación E32 M40.

CONCLUSION

De manera preliminar se concluye que los caracteres morfológicos más importantes para la caracterización de la diversidad son los de tubérculo. Mientras que de los caracteres moleculares mostrarían la amplia variabilidad genética dentro de la colección de mashua.

Agradecimiento: El presente trabajo fue financiado por el proyecto AGROECO, con fondos del Programa Canadiense de Investigación Internacional en Seguridad Alimentaria (CIFSRF).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICA

- Alagón, R. y Rosas, M. 2008. Caracterización molecular de mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruiz y Pavón) de las comunidades campesinas de Cusco y Huánuco, mediante marcadores AFLP. Tesis Ing. Biotecnólogo Arequipa. 179 pp.
- Grau, A., Ortega R., Nieto C., y Hermann M. 2003. Mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pav.). Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. 25. International Potato Center, Lima, Peru/International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy.

- Malice M., Bizoux J., Blas R. y Baudoin J. 2010. Genetic Diversity of Andean Tuber Crop Species in the in situ Microcenter of Huanuco, Peru. *Crop Sci.* 50:1915–1923
- Ortega R., Duran E., Arbizu C., Roca W. Potter D. y Quiros C. 2007. Pattern of genetic diversity of cultivated and non-cultivated mashua, *Tropaeolum tuberosum*, in the Cusco region of Peru. *Genet Resour Crop Evol* 54:807–821.
- Pissard A., Arbizu C., Ghislain M., y Bertin P. 2008. Influence of geographical provenance on the genetic structure and diversity of the vegetatively propagated andean tuber crop, mashua (*tropaeolum tuberosum*), highlighted by intersimple sequence repeat markers and multivariate analysis methods. *Int. J. Plant Sci.* 169(9):1248–1260.
- Vos, P; Hogers, R; Bleeker, M; Reijans, M; Van De Lee, T; Hornes, M; Frijters, A; Pot, J; Peleman, J; Kuiper, M; Zabeau, M. 1995. AFLP: A new technique for DNA Fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 23:4407-4414.

Uso de AFLP para determinar la variabilidad genética de los hongos *Moniliophthora roreri* y *Moniliophthora perniciosa* provenientes de seis zonas cacaoteras del Perú, 2012.

Bertha Melgar Rios, María Valderrama Valencia.
Universidad Católica de Santa María.

Resumen

Las dos enfermedades más devastadoras que afectan al cultivo de cacao Moniliasis y Escoba de Bruja son causadas por dos hongos (*Moniliophthora roreri* y *Moniliophthora perniciosa*) respectivamente y están presentes en la mayoría de países latinoamericanos que cultivan cacao. Se ha descrito patotipos gracias a su caracterización morfológica, sin embargo a nivel microscópico no pueden ser diferenciadas. Por lo que el presente estudio utilizó la técnica AFLP para determinar la variabilidad genética de 21 aislamientos de *M. roreri* y 12 aislamientos de *M. perniciosa* que fueron aislados de seis de las principales zonas productoras de cacao reportadas por el MINAG. Para el aislamiento de los hongos, el material vegetal fue recolectado, desinfectado y colocado en cámaras húmedas, posteriormente se realizó la caracterización morfológica de los hongos, para luego realizar la extracción del ADN y aplicar la técnica de AFLP a cada uno de los aislados. El análisis de distancia genética fue obtenido con el programa Past versión 2.17b, se utilizó el coeficiente de similitud de Jaccard para graficar los dendogramas generados para cada especie de hongo. Para la especie *roreri* se generaron 3 grupos a 0.84 de similitud y para la especie *M. perniciosa* se generaron 3 grupos a 0.72 de similitud. Para hallar la variabilidad poblacional se utilizó el programa Popgene versión 1.32. Los resultados obtenidos para la especie *M. roreri* muestra que este hongo presenta una moderada variabilidad medida a partir del porcentaje de loci polimórfico (41,67%) y entre las poblaciones la zona de Tocache es la que presenta el mayor porcentaje de loci polimórficos (26,14%). El valor del coeficiente de diferenciación genética (Gst) entre las poblaciones de *M. roreri* fue de 0.2950. Para el caso de la especie *M. perniciosa* esta presentó un valor de variabilidad alta siendo su valor de porcentaje de loci polimórfico de 67,39% y la población de Tocache fue la que presentó mayor porcentaje de loci polimórfico (65,94%). El coeficiente de diferenciación genética (Gst) entre las poblaciones de *M. perniciosa* fue de 0.2787. Por último se realizó un análisis entre la población conservada y las muestras aisladas recientemente para cada especie de hongo estudiada y los resultados muestran que existe mayor variabilidad en las poblaciones que fueron aisladas recientemente medida a partir del porcentaje de loci polimórfico y los valores de Gst obtenidos muestran que existe mayor variabilidad dentro de cada población aislada que entre ellas.

INTRODUCCION

Los hongos *Moniliophthora roreri* y *Moniliophthora perniciosa* son los causantes de las dos enfermedades más devastadoras del cacao (*Theobroma cacao* L.) en América del Sur y el Caribe. En el Perú, durante la década de los ochenta e inicios de los noventa, la producción nacional de cacao se vio afectada por la influencia de diversos factores como la falta de seguridad personal en el campo por la violencia narcoterrorista, caída internacional de los precios del cacao, auge de los precios de la coca y la creciente diseminación de plagas del cultivo (Moniliasis y Escoba de Brujas) (MINAG 2003). En los departamentos de San Martín y Huánuco se vio afectada su producción cacaotera por Moniliasis en un 30 %; mientras que la zona del VRAE en un 60% y Jaen – San Ignacio en un 80%. Para el caso de la enfermedad Escoba de bruja el porcentaje afectado fluctúa entre el 15 y 30% entre las principales zonas cacaoteras según cifras del MINAG. Los hongos poseen más diversidad genética que otros grupos de patógenos microscópicos. Esta variación puede afectar a todos los aspectos de la biología de estos organismos y rápidamente les permite evolucionar a nuevos tipos de patógenos en respuesta a los avances en la mejora de cultivos. Aunque los niveles de variabilidad de los hongos se pueden estimar usando caracteres morfológicos, esta fuente de información no ha demostrado ser fiable para la identificación y la discriminación de muchos hongos, debido a la dificultad para detectar un número suficiente de caracteres que permitan una solución completa, además, muchos de los caracteres morfológicos que se utilizan para fines de identificación pueden estar fuertemente influenciados por el medio ambiente. La aplicación de una serie de técnicas basadas en el ADN ha proporcionado herramientas para la discriminación de los hongos estrechamente relacionados en casi cualquier resolución requerida y también para la detección de especies de hongos en las sensibilidades, mucho más allá de los métodos tradicionales (Mills R., et al., 1998; Tamakatsu S., 1998). La necesidad de un análisis genético es el desarrollo de herramientas que pueden discriminar entre entidades biológicas con diferentes caracteres determinados genéticamente (Wang R. y Schmidt E., 1998). La técnica AFLP se utilizó en el presente estudio para generar marcadores moleculares de naturaleza dominante y que representa una manera relativamente barata y eficaz para evaluar la variabilidad genética de 21 aislamientos de *M. roreri* y 12 aislamientos de *M. perniciosa* recolectados de seis zonas cacaoteras del Perú.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento y caracterización de los hongos: El presente trabajo se llevó a cabo en los Laboratorios de Fitopatología y Biotecnología del Instituto de Cultivos Tropicales (ICT) en la Estación Experimental Juan Bernito localizado en el distrito de la Banda de Shilcayo, Tarapoto, departamento de San Martín. Se recolectaron tallos y mazorcas de cacao que presentaban síntomas de las enfermedades moniliasis y escoba de bruja de seis zonas productoras de cacao del Perú (Tocache, Mariscal Cáceres, Tarapoto, Leoncio Prado, Vrae, San Ignacio). El aislamiento se realizó utilizando protocolos de cámara húmeda estandarizados por el Laboratorio de Fitopatología del Instituto de Cultivos Tropicales (ICT, 2012). Para la purificación y caracterización de los aislados, se efectuaron pruebas de crecimiento en distintos medios de cultivo (Medio PDA modificado, medio a base de cacao IMC – 67 y medio extracto de levadura) y se realizó un análisis macroscópico y microscópico a los aislamientos comparándolas con las muestras conservadas en el laboratorio de fitopatología considerándolas como control positivo.

Extracción y cuantificación del DNA genómico: La extracción se realizó utilizando el Kit Archive Pure DNA Cell/Tissue – 4g (5Prime) con una ligera modificación en el paso de lisis celular. Para cuantificar y determinar la pureza del DNA se leyó en el espectrofotómetro (Thermo Scientiest UV Vis Genesys) a una longitud de onda de 260 y 280 nm utilizando una dilución 1:100. La

calidad del DNA extraído fue evaluado en gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio (0.02 $\mu\text{l ml}^{-1}$) y se corrió en una cámara electroforética horizontal (Phero Sub 2632E) a 90 v. por una hora utilizando TBE 1X como tampón de corrida.

Aplicación de la técnica de AFLP en todos los aislados: Para la digestión del DNA genómico se usó dos enzimas de restricción EcoRI y MseI. La reacción se hizo en tubos de PCR que contenía 10 μl DNA (50 ng/ μl), 1 μl EcoRI, 0.5 μl MseI, 2 μl de Buffer Fast Digest 10X y 6.5 μl de agua molecular estéril, seguidamente se incubó (Membert) por 2 horas a 37°C. La ligación de adaptadores de doble cadena se realizó inmediatamente añadiendo al mismo tubo 0.4 μl T4 DNA Ligasa, 1 μl de Adaptador EcoRI, 1.25 μl Adaptador MseI y 2.5 μl de Buffer ligasa a 16 °C por 4 horas. La preamplificación (+1/+1) se realizó en tubos de PCR conteniendo 5 μl de mezcla de Digestion-Ligación 1:5, 8.5 μl de cada Preamplificador EcoRI y MseI 10 mM, 2.5 μl de Buffer PCR 10X (Fermentas), 0.2 μl Taq DNA polimerasa (Fermentas), 1.25 μl de DNTP mix (dATP, dCTP, dGTP and dTTP Fermentas), 0.6 μl de CIMg 50 mM y 13.4 μl de agua molecular estéril. El termociclador (Nxy technic Amplitronyx 6 gradiente) fue ajustado al siguiente programa: 2 min a 72°C, 4 min a 94°C, 22 ciclos (30 s a 94°C, 1 min a 56°C, 1 min a 72°C), 5 min a 72°C y luego la temperatura de la muestra fue reducida a 4°C. La amplificación selectiva (+3/+3) se realizó en tubos de PCR conteniendo 2 μl del producto de la preamplificación 1:4, 2 μl EcoRI (50ng/ μl), 0.3 μl MseI (50ng/ μl), 1.1 μl de Buffer PCR 10X (Fermentas), 0.15 μl Taq DNA polimerasa (Fermentas), 0.6 de DNTP mix (dATP, dCTP, dGTP and dTTP Fermentas), 0.6 μl de Cloruro de magnesio 50 mM, 3.25 μl de agua molecular estéril y 5 μl de aceite natural. El termociclador fue ajustado al siguiente programa: 4 min a 94°C, 20 s a 94°C, 30 s a 65°C, 2 min a 72 °C, 10 ciclos (20 s a 94°C, 30 s a 65°C bajando un grado por ciclo, 2 min a 72°C), 20 ciclos (20 s a 94°C, 30 s a 56°C, 2 min a 72°C), 30 min a 60°C y luego la temperatura fue reducida a 4°C. Los productos de la amplificación selectiva se mezclaron con 2 μl de tampón de carga azul de bromofenol y se realizó una desnaturalización de la muestra (5 min a 95°C) para luego cargar 4 μl de muestra en el gel de poliacrilamida 10%.

Análisis de datos: Se creó una matriz binaria en una hoja de Excel directamente a partir de los geles fotografiados con una cámara digital (Lumix Panasonic) y se realizó el trabajo de escoreo asignando los valores de presencia (1) y ausencia (0) a cada banda de ADN. A los fragmentos con tenue amplificación, se les asignó el símbolo de “?” consignándolos como datos perdidos. Se determinó el Índice de contenido polimórfico (PIC) y se realizó el análisis de distancia genética con la ayuda del programa Past 2.17b. Se obtuvo la matriz de similitud utilizando los coeficientes de Jaccard y Dice; luego se llevó a cabo un agrupamiento UPGMA que se graficó en un dendograma. Finalmente, se comprobó la independencia de ambas matrices y el nivel de confianza, realizando una validación interna (De Vicente C., et al., 2004), determinando el coeficiente de correlación cofenética (r). También se realizó el análisis de la variabilidad poblacional utilizando el software Poppene versión 1.32, y por el cual se estimaron los siguientes parámetros: Porcentaje de Loci polimórficos dentro y entre las poblaciones (%PPL), Diversidad Genética de Nei (h), Coeficiente de diferenciación genética (Gst).

RESULTADOS Y DISCUSION

El material vegetal infectado y sembrado en cámaras húmedas permitieron el desarrollo de micelios casi puros, que posteriormente fue llevado a placas con medio PDA modificado (PSA) para obtener cepas puras y poderlas caracterizar. Según las comparaciones hechas de nuestras muestras con las muestras conservadas, teniendo en cuenta el crecimiento y la morfología de los micelios se puede concluir que los aislados provenientes de las mazorcas con síntomas de moniliasis pertenecen al hongo *M. roleri* por ser de micelio afelpado y color crema a café claro/oscurito (Castaño J., 1952; Cubillos G., 1981; Suárez C., 2004; Phillips W., 2006) en cambio para la mazorca y tallos que presentaban síntomas de escoba de bruja, pertenecen al hongo *M. pernicioso* con micelio blanco algodonoso que al paso del tiempo llega a tener un color amarillento. Una vez caracterizado por su morfología para verificar esta clasificación se pasó a sembrar en medios específicos que hacen una mejor diferenciación de los aislados. Los medios de cultivo PSA, medio extracto de levadura y medio a base de cacao IMC – 67 presentaron buenos resultados para el crecimiento de los patógenos, sin embargo los medios extracto de levadura y medio a base de cacao IMC – 67 llamados medios específicos para cada especie de hongo, permitieron obtener un micelio más denso y robusto, además la de acelerar el crecimiento del micelio. Villavicencio M., (2010) reportó el uso del medio PDA para aislar y purificar muestras de *M. roleri*, sin embargo utiliza el medio V8MAA (Jugo V8-Maltosa-Asparagina-Agar) para la caracterización de las mismas. Arbelaez L., (2010) concluye que el medio más indicado para la caracterización morfológica, y que le permitió el crecimiento y esporulación de aislamientos de *M. roleri* de Antioquia fue agar extracto de malta más V8, también indican que el medio menos favorable para el desarrollo del hongo *M. roleri* fue el medio V8 sin ningún aditivo estos resultados difieren a los obtenidos por Phillips W., (2003) quien reportó al agar V8 como el medio más adecuado para el crecimiento y esporulación de aislamientos de *M. roleri* procedentes de diferentes zonas cacaoteras de Sur y Centro América. Meinhardt W., (2006) habiendo realizado estudios de producción de micelio de *M. pernicioso* para mantener la fase biotrófica, menciona la utilización del medio LMCpL compuesto por extracto de levadura, glicerol, K₂HPO₄ y oligoelementos que le permitió el desarrollo de micelio más vigoroso, también probó otras fuentes de carbono como etanol, fructuosa, glucosa, glicerol, sorbitol y sucrosa, el cual permitieron que el micelio se convierta rápidamente en su fase saprófita excepto con glicerol como fuente de carbono. Resultados que difieren con los obtenidos en este estudio ya que el medio extracto de levadura que contiene glicerol permitió el desarrollo del micelio saprofito del hongo *M. pernicioso*.

La evaluación macroscópica de *M. roleri* se realizó al sexto día después de ser sembrado, observando en todos los aislamientos micelio que crecía formando una capa delgada tipo afelpada sobre la superficie del medio de cultivo característica reportada por Arbelaez L., (2010); las tonalidades observadas en la coloración del micelio variaron según los días de crecimiento siendo manifestado por algunos autores (Castaño J., 1952; Cubillos G., 1981; Suárez C., 2004; Phillips W., 2006). Todos los aislamientos presentaron borde plumoso y aspecto pulverulento a causa de la producción de esporas, características descritas por Phillips W., (2003). El examen al microscopio también se evaluó en el sexto día de crecimiento, el cual mostró esporas en su mayoría con forma globosas y pocas subglobosas y/o elípticas. Estas formas coinciden con las reportadas por Evans C., et al., (1978) y Suárez L., (2004). La evaluación macroscópica de *M. pernicioso* se realizó al noveno día después de ser sembrado; el micelio de todos los aislados crecían formando una capa algodonosa, la colonia de este hongo es de color blanco y conforme se va envejeciendo estas presentaban algunas tonalidades amarillas, característica también reportada por Pires A., et al., (2009). Con respecto al borde de la colonia esta no era bien definido, 8 aislamientos crecieron de

forma radial y 4 presentaban borde irregular. Meinhardt W., et al., (2006) reportaron que los bordes de la colonia representaban la fase saprófita del hongo. El examen microscópico se evaluó también en el noveno día de crecimiento, en este análisis se observó la fase saprófita pudiendo distinguir micelio binucleado con conexiones o “clampas”, esta característica también fue reportada por Kilaru A. y Hasenstein K., (2005); Meinhardt W., et al., (2008); Pires A., et al., (2009); Orozco A., et al., (2010) y Ferreira L., et al., (2012); en dicha fase. El número total de muestras utilizadas para el análisis de variabilidad genética fue 21 aislamientos de *M. roleri* y 12 aislamientos de *M. perniciososa* contando con las cepas que se mantenían conservadas y previamente caracterizadas.

Para aplicar la técnica de AFLP se realizó una pre selección de los cebadores con cuatro aislados de cada especie, para esta elección se trabajó con una total de 24 combinaciones realizadas al azar; Para la amplificación de DNA de todos los aislados se eligieron los que dieron mejor respuesta en el proceso de pre selección tomando como criterio el número de bandas marcadoras, siendo así para los aislamientos de *M. roleri* se utilizaron 16 combinaciones de cebadores (EcoRI-ACC MseI-CAA; EcoRI-AAC MseI-CAA; EcoRI-AAC MseI-CTT; EcoRI-AGC MseI-CAA; EcoRI-AAC MseI-CTG; EcoRI-ACC MseI-CAG; EcoRI-ACC MseI-CTT; EcoRI-AAC MseI-CTC; EcoRI-AAC MseI-CAG; EcoRI-ACT MseI-CAA; EcoRI-ACA MseI-CAA; EcoRI-AAC MseI-CAC; EcoRI-AAG MseI-CTC; EcoRI-AAG MseI-CAC; EcoRI-AGG MseI-CAA; EcoRI-ACG MseI-CAA) y para los aislamientos de *M. perniciososa* se utilizó 7 combinaciones de cebadores (EcoRI-ACC MseI-CAA; EcoRI-AAC MseI-CAA; EcoRI-AAC MseI-CTC; EcoRI-AAC MseI-CAG; EcoRI-ACT MseI-CAA; EcoRI-ACA MseI-CAA; EcoRI-AGG MseI-CAA). Para *M. roleri* se generaron 264 fragmentos de DNA amplificados, de las cuales solo 110 fueron polimórficas. Para *M. perniciososa* se recopiló un total de 138 fragmentos de DNA amplificados, de las cuales 92 fueron polimórficos. Para este estudio las bandas utilizadas para el escoreo fueron las bandas de peso molecular entre 80 y 500 pb sugerido por Blas, 2010; debido a que las bandas amplificadas menores a 500 pb presentaban fragmentos polimórficos entre las diferentes especies las cuales son útiles para estudios de variabilidad. En nuestro estudio las bandas entre 500 y 1000 pb presentaron bandas monomórficas, la cual no aportaban información para los estudios de variabilidad.

Los marcadores con promedio de PIC más altos hallados en los aislamientos de *M. roleri* los tienen las combinaciones números 1, 8,10, 14 y 16; y para los aislamientos de *M. perniciososa* los tienen las combinaciones número 1, 2, y 3 por lo tanto se pueden constituir como bandas marcadoras que permiten la determinación de la variabilidad de cada grupo de aislados en estudio. Este parámetro también fue utilizado en otros estudios como Silva M., (2011) en aislados de *M. roleri*. Reategui F., (2007) y Chia J., (2009) quienes utilizaron muestras de cacao e indicaron la efectividad y discriminación de sus marcadores para estudios de variabilidad. Para la construcción de la matriz de similitud se tomó en cuenta el criterio de Ghislain M., et al., (1999); quien indica que para los marcadores cuyos valores de PIC se encuentra dentro de este rango, $0,1 < PIC < 0,5$ se consideran como los que proporcionan niveles informativos. Para determinar cuan relacionados están los aislados de cada especie se determinó la variabilidad de las longitudes de los fragmentos amplificados utilizando un análisis de distancia genética, para los 21 aislamientos de *M. roleri* se trabajó con 264 loci y para los 12 aislamientos de *M. perniciososa* con 138 loci ordenados en una “matriz binaria”. Se trabajó con el software Past versión 2.17b, se introdujo la matriz de datos binarios construida a partir de los datos de AFLP y se obtuvo dos matrices de similitud usando los coeficientes de similitud de Jaccard y Dice, a su vez estas matrices se utilizaron para agrupar a los aislamientos de cada tipo de hongo en un análisis basado en el procedimiento UPGMA, el resultado de este procedimiento se graficó en un dendograma o árbol fenético. También se realizó una validación interna utilizando el coeficiente de correlación cofenética (r), para las dos especies estos valores fueron altos cayendo dentro del rango de buena correspondencia, pero sin embargo se utilizó el coeficiente de similitud de Jaccard ya que reflejaba un mejor ajuste del análisis de agrupamiento por los dendogramas obtenidos. El dendograma obtenido para el hongo *M. roleri* (Figura N°1) proporcionó una buena representación de la clasificación del material en estudio; en este dendograma podemos visualizar a 0.84 de similitud 3 grupos (I, II y III). En general el dendograma indica que las muestras de *Moniliophthora roleri* no muestran un patrón sólido de agrupación con respecto al origen geográfico de las muestras, lo que podría estar indicando que existe intercambio genético entre las poblaciones ya que el movimiento de genes facilita la similitud entre las

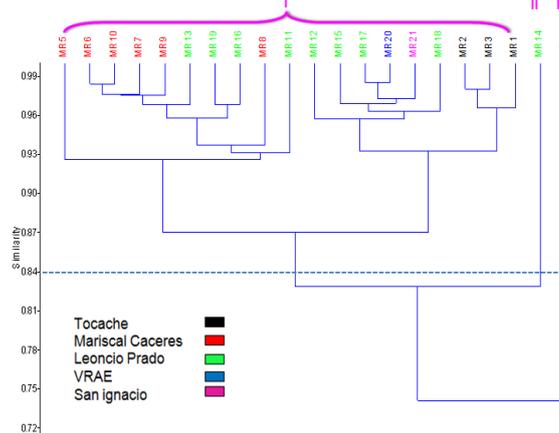


Figura N°1. Dendograma generado para 21 aislamientos de *Moniliophthora roleri* usando la técnica AFLP.

poblaciones, de todos modos no se puede afirmar del todo ya que se tendría que trabajar con una mayor cantidad de aislamientos sobretodo de las zonas productoras de San Ignacio y VRAE ya que precisamente de estos lugares solo se trabajó con un aislamiento de cada zona. Para el caso de *M. perniciososa* en el dendograma generado podemos visualizar a 0.72 de similitud 3 grupos (I, II y III) (Figura N°2). El dendograma obtenido para esta especie muestra un alto nivel de diferenciación dentro del grupo total en estudio; sobre todo el aislamiento que se separó formando el Grupo III (MP10) que fue obtenido a partir de fruto y posiblemente esté generando una variabilidad genética importante comparado con los aislamientos provenientes de tallos y basidiocarpos (MP7 y MP12).

Para el análisis de variabilidad poblacional los aislamientos de *M. roreri* se dividieron en tres poblaciones Tocache, Mariscal Cáceres y Leoncio Prado. Los resultados arrojaron que el porcentaje de loci polimórfico total (%PPL) fue de 41.67%, mientras que la población donde se encontró mayor polimorfismo fue Tocache con 26.14%, seguida por la población de Leoncio Prado con 23.48% y por último Mariscal Cáceres con 8.71%; los resultados obtenidos en este estudio fluctúan con los reportados por Cunha R., (2006). Una mejor y generalizada medida de la variación es la heterocigosidad o coeficiente de Diversidad genética de Nei (h), el resultado entre las tres poblaciones fue de 0.0896 y dentro de cada población la de Tocache fue la que

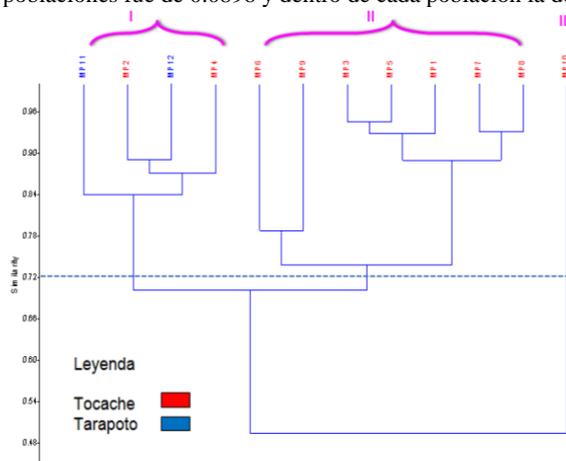


Figura N°2. Dendrograma generado para 12 aislamientos de *Moniliophthora perniciosa* usando la técnica AFLP.

con 26.14%, seguida por la población de Leoncio Prado con 23.48% y por último Mariscal Cáceres con 8.71%; los resultados obtenidos en este estudio fluctúan con los reportados por Cunha R., (2006). Una mejor y generalizada medida de la variación es la heterocigosidad o coeficiente de Diversidad genética de Nei (h), el resultado entre las tres poblaciones fue de 0.0896 y dentro de cada población la de Tocache fue la que obtuvo el valor más alto de diversidad genética; el valor de diversidad genética de Nei obtenido por Silva M., (2011) fue más alto que el obtenido en este estudio, pero igual mantiene la frecuencia de alelos diferentes entre las poblaciones. El coeficiente de diferenciación genética (G_{ST}) obtenido fue relativamente bajo (0.2950; 29.5%) el cual indica que los aislamientos de *M. roreri* son más diversos dentro de una misma población que entre poblaciones y que aproximadamente el 29% de la variación detectada se debe a la diferenciación entre los individuos de una misma población. Para el análisis de variabilidad poblacional de *M. perniciosa* se trabajó con dos poblaciones, Tocache y Tarapoto. El porcentaje de loci polimórfico (%PPL) obtenido entre las poblaciones de *M. perniciosa* estudiadas fue de 67.39% y la población de Tocache con un porcentaje de 65.94% y Tarapoto con 8.7%. Este valor de %PPL en Tarapoto podría deberse a que solo se hizo el análisis con dos aislados. El coeficiente de Diversidad genética de Nei (h) entre las dos poblaciones fue de 0.1866, este valor indica que en las dos poblaciones existen poca cantidad de alelos que poseen frecuencias iguales. El coeficiente de diferenciación genética (G_{ST}) fue de 0.2787 (27.87%) este valor nos indica que los aislamientos de *M. perniciosa* son más diversos dentro de un mismo grupo que entre grupos y que aproximadamente el 27% de la variación detectada se debe a la diferenciación entre los individuos de una misma población.

También se determinó para cada especie, la variabilidad poblacional entre las muestras que se encontraban conservadas y las muestras que recién fueron aisladas y los resultados indican que la mayor variabilidad la posee la población que fue aislada recientemente; estos resultados nos podrían indicar que el genoma de esta especie a través del tiempo va desarrollando mayor variabilidad lo que sugiere mayor agresividad para atacar a su huésped, un dato bastante alarmante tratándose de dos hongos que desde su aparición viene ocasionando pérdidas alarmantes en el cultivo del cacao.

Agradecimientos

La presente investigación no hubiese sido realizada sin la ayuda del Instituto de cultivos tropicales de Tarapoto quien lleva a cabo investigaciones en Cacao por lo que este artículo es una parte de todo un proyecto que ellos llevan a cabo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- **Arbelaez L.** Análisis de la diversidad intraespecie de *Moniliophthora roreri* (cif.) Evans et al. por medio de marcadores morfológicos y genéticos. Tesis de Magister. Medellín: Universidad de Colombia. 2010.
- **Castaño J.** Moniliasis del cacao en una región del departamento de Caldas. Agricultura Tropical. 1952, 8: 21-25p.
- **Chia J.** Caracterización molecular mediante marcadores ISSR de una colección de 50 árboles clonales e híbridos de cacao (*Theobroma cacao* L.) de la UNAS. Tesis de Maestría. Tingo María: Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 2009.
- **Cubillos G.** Exploraciones acerca de la importancia que tienen los frutos enfermos dejados sobre el suelo como fuentes primarias de infecciones de *Moniliophthora roreri* (Cif. y Par.) Evans et al. El Cacaotero Colombiano. 1981; 18: 38-43p.
- **Cunha MR.** Estructura genética de populações de *Crinipellis perniciosa* e *Moniliophthora roreri* utilizando Marcadores RAPD e SSR. Doctorado. Sao Paulo: Universidad Estatal Paulista. 2006.
- **De Vicente MC, López C, Fulton T.** Genetic diversity analysis with molecular marker data. International Plant Genetic Resources Institute (Rome, Italy), Universidad Nacional Agraria La Molina (Perú) y Institute for Genomic Diversity - Cornell University (NY, USA). 2004.
- **Evans C, Stalpers JA, Samson RA, Benny GL.** On the taxonomy of *Monilia roreri*, an important pathogen of *Theobroma cacao* in South America. Canadian Journal of Botany. 1978; 56: 2528-32p.
- **Ferreira L, Duarte K, Gomes L, Carvalho R, Leal Junior G, Aguiar M, Armas R, Tavares F.** Genetic diversity of polysporic isolates of *Moniliophthora perniciosa* (Tricholomataceae). Genetics and Molecular Research. 2012; 11: 2559-2568.

- **Ghislain M, Zhang D, Fajardo D, Huamann Z, Hijmans RH.** Marker-assisted sampling of the cultivated Andean potato *Solanum phureja* collection using RAPD markers. *Genet. Resour.* 1999; 46: 547-555p.
- **Kilaru A, Hasenstein HK.** Development and Pathogenicity of the Fungus *Crinipellis perniciosa* on Interaction with Cacao Leaves. *Biochemistry and Cell Biology (Louisiana).* 2005; 95: 101-107.
- **Meinhardt LW, Bellato C, Rincones J, Azevedo RA, Cascardo J, Pereira G.** In Vitro Production of Biotrophic-Like Cultures of *Crinipellis perniciosa*, the Causal Agent of Witches Broom Disease of *Theobroma cacao*. *Current Microbiology.* 2006; 52: 191-96.
- **Meinhardt LW, Rincones J, Bailey BA, Aime MC, Griffith GW, Dapeng Z, Pereira GA.** *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of witches' broom disease of cacao: what's new from this old foe. *Molecular plant Pathology.* 2008; 9: 577-588.
- **Mills PR, Sreenivasaprasad S, Muthumeenakshi S.** Molecular variability of fungal pathogens. (Local: CAB International). 1998; 105-120p.
- **MINAG.** Caracterización de las zonas productoras de cacao en el Perú y su competitividad. (Lima). 2003; 207p.
- **Orozco CA, Osorio C, Botero MJ, Rivera FA, López GA.** Evaluación microbiológica y molecular de *Moniliophthora perniciosa* (agaricales: marasmiaceae). *Boletín Científico. (Caldas).* 2010; 15: 41-47.
- **Phillips W.** La moniliasis del cacao: un enemigo que podemos y debemos vencer. Taller regional andino de aplicación tecnológica en el cultivo de cacao. (Quevedo, Ecuador). 2006; 21-25p
- **Phillips W.** Origin, Biogeography, Genetic Diversity and Taxonomy affinities of the cacao (*Theobroma cacao* L.) fungus *Moniliophthora roreri* (Cif.) Evans et al as determined using Molecular, Phytopathological and Morphophysiological evidence. Thesis PhD. London: University of Reading. 2003.
- **Pires A, Gramacho K, Silva D, Góes A, Silva M, Muniz J, Porto R, Villela C, Brendel M, Cascardo J, Pereira G.** Early development of *Moniliophthora perniciosa* basidiomata and developmentally regulated genes. *BMC Microbiology.* 2009; 9: 18p.
- **Tamakatsu S.** PCR applications in fungal phylogeny. Applications of PCR in mycology. (UK: CAB International). 1998; 125-152p
- **Villavicencio VM.** Caracterización morfológica, fisiológica y patogénica de *Moniliophthora roreri* aislados de cinco Provincias de la Costa Ecuatoriana. Tesis de grado. Guayaquil: Escuela Politécnica; 2010.
- **Wang R, Schmidt E.** Population genetic analysis of pathogenic forest fungi. Sweden: Department of Forest Genetics and Plant Physiology, Swedish University of Agricultural Sciences. 1998.

Multiplicación *in vitro* de *Myrocarpus frondosus* Allemão (incienso) a partir del establecimiento de semillas.

Noguera, A. M. ¹; Martínez, M. E. ²

¹ Mgter. en Biotecnología, Lic. Genética. Docente Investigador, Laboratorio de Biotecnología, Facultad de Ciencias Forestales, UNaM. Bertoni 124 (3380), Eldorado, Misiones, Rep. Argentina. E-mail: amnogue@arnet.com.ar

² Mgter. en Biotecnología, Ing. Ftal. Investigador, Laboratorio de Biotecnología, Facultad de Ciencias Forestales, UNaM. Bertoni 124 (3380), Eldorado, Misiones, Rep. Argentina. E-mail: micaevelin@yahoo.com.ar

RESUMEN

Myrocarpus frondosus Allemão (Incienso) es una especie leñosa con aptitudes maderables, la tala selectiva y la pérdida de superficie boscosa a llevado a su disminución y consecuente pérdida de variabilidad genética. La propagación *in vitro* es una herramienta para la conservación de germoplasma y la propagación de árboles selectos. El presente trabajo tuvo como objetivo desarrollar la fase de establecimiento y multiplicación *in vitro* de *Myrocarpus frondosus*. Se ensayaron tratamientos de desinfección en semillas para su establecimiento utilizando, hipoclorito de sodio en distintas concentraciones y tiempo de exposición. En la multiplicación de ápices y segmentos nodales de plántulas *in vitro* se estudiaron diferentes concentraciones de 6-Bencilaminopurina (0,1; 0,25; 0,5 y 1 mg/L) y ácido naftalenacético (0,1 mg/L). Se obtuvo en el establecimiento de semillas un 6,5 % de germinación con 3 % de hipoclorito de sodio. La mejor respuesta en la multiplicación se logró con 1 mg/L de 6-BAP y 0,1 mg/L ANA.

Palabras Claves: Micropropagación, Fabaceae.

SUMMARY

Myrocarpus frondosus Allemão (Incienso) is a species with excellent qualities for timber. Its selective felling combined with the loss of woodland as a result of advancing agriculture areas has reduced its presence and as a consequence the loss of genetic variability. The micropropagation of vegetal species offers an important tool for conserving germoplasm and for propagating selected trees. The objective of the present research work consisted in developing a protocol for establishment and multiplication of *M. frondosus*. Different disinfection treatments for seeds were tested with sodium hypochlorite solution at different concentrations and exposition times. In the multiplication phase, different treatments were tested with 6-Bencilaminopurina (0,1; 0,25; 0,5 y 1 mg/L) y Naftalenacetic acid (0,1 mg/L). Was obtained for establishment an 6,5 % of germination with a sodium hypochlorite solution at 3%. The best answer in the multiplication was obtained with 1 mg/L of 6-BAP y 0,1 mg/L ANA.

Key words: micropropagation, Fabaceae.

INTRODUCCIÓN

Myrocarpus frondosus Allemão (FABACEAE) conocida como Incienso, especie leñosa de gran porte. Habita bosques semihúmedos y las franjas de transición entre los bosques altos y los bosques bajos. Su fruto es una sámara, con presencia de bálsamo y una a dos semillas. Posee una madera de alto valor económico tanto en el mercado nacional como internacional. Además es una especie melífera y de su corteza se extraen alcaloides, para la industria de la perfumería y tinturas.

El principal problema que presenta *M. frondosus*, es la poca disponibilidad de semillas aptas para la siembra, la cantidad de árboles por hectárea es muy baja y limita la disponibilidad de semillas. Por otro lado las mismas son frágiles, y preferentemente hay que cosecharlas del árbol, ya que cuando caen los frutos se pudren rápidamente, debido a la humedad del bosque y a la cobertura tan delicada que posee la semilla, así mismo, las semillas de Incienso son recalcitrantes y de baja viabilidad (Corvalho, 1994, y Eibl, 2002) por lo tanto la conservación de los frutos, no debe exceder los tres meses para garantizar una cierta viabilidad (Lorenzi, 1999). Es también frecuente la presencia de contaminante endógenos, en el interior de los tejidos (Teixeira, 1993). Desde esta problemática, se plantea que las técnicas biotecnológicas son una de las herramientas para la conservación y multiplicación de esta especie. El cultivo *in vitro* de tejidos vegetales tiene una aplicación práctica en la clonación, conservación, y manipulación del material vegetal. Según investigaciones en especies leñosas un adecuado balance de auxinas y citoquininas es indispensable para el éxito del cultivo *in vitro* y la formación de plantas a partir de los diferentes tipos de explante, el cual está determinado por las concentraciones endógenas de estos reguladores de crecimiento presentes en el explante (Jiménez, 1998). Ante la necesidad de rescatar especies forestales nativas de la selva misionera, que pueden estar bajo amenaza de extinción y que presentan dificultades para propagarse y que poseen valor económico, utilizando técnicas de la biotecnología es posible la micropropagación *in vitro* de *M. frondosus*.

El objetivo del presente trabajo fue; el desarrollo de una metodología para la germinación de semillas *in vitro* de *M. frondosus*, y evaluar medios de cultivos para su multiplicación *in vitro* que permitan generar una técnica para mejorar su producción, rescate y conservación.

MATERIAL Y METODOS

El presente estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Propagación Vegetativa de la Facultad de Ciencias Forestales de la Universidad Nacional de Misiones (UNaM), Eldorado, Misiones, Argentina.

El material vegetal utilizado fue, semillas provenientes de árboles semilleros de Incienso, que fueron tratadas de la siguiente manera: se realiza el corte de las alas del fruto, luego se efectúa un enjuague en hipoclorito de sodio al 0,5 % (en condiciones de laboratorio), y en cabina de flujo laminar se realiza escarificación y desinfección de las mismas, con alcohol al 70 % durante 60 seg., seguido de una solución de hipoclorito de sodio al 1% y 3 % durante 15 min en agitación, realizando un triple enjuague con agua destilada estéril. Posteriormente se extrae la cubierta seminal y se procede a una segunda desinfección con alcohol al 70 % por 30 seg, seguido de una solución al 1 % de hipoclorito de sodio durante 10 min., con triple enjuague en agua destilada estéril. Para cada tratamiento el número de repeticiones fue de 60 semillas, siendo la semilla la unidad experimental. En la fase de multiplicación se utilizaron ápices caulinares y segmento uninodales de 1 cm. conteniendo al menos una yema, provenientes de plántulas germinados *in vitro*. El medio de cultivo basal empleado fue Murashige y Skoog (MS) 1962, suplementado con 2 % de sacarosa, en estado semisólido gelificado con 0,8 % de agar. El pH del medio de cultivo fue de 5,8 y se esterilizo en autoclave a 121 °C de temperatura y 1,2 kg/cm² de presión durante 20 minutos. Las condiciones de cultivo son 27 °C +/- 2 °C, fotoperíodo de 16 horas luz fría. Durante la multiplicación se evaluaron los siguientes reguladores de crecimiento: Ácido naftalenacético (ANA), 6-bencilaminopurina (6-BAP) y se realizaron subcultivos cada 45 días para determinar el coeficiente de multiplicación. En los subcultivos 1, 2 y 3 los explantes se multiplicaron en medio MS completo y suplementado con 1 mg/L de 6-BAP y 0,1 mg/L ANA, 2 % sacarosa y 0,8 % agar. A partir del cuarto subcultivo se evaluaron los siguientes tratamientos: 1: 0,1 mg/L de 6-BAP y 0,1 mg/L ANA; 2: 0,25 mg/L de 6-BAP y 0,1 mg/L ANA; 3: 0,5 mg/L de 6-BAP y 0,1 mg/L ANA; y 4: 1 mg/L de 6-BAP y 0,1 mg/L ANA.

El diseño experimental utilizado fue completamente aleatorizado, con una distribución factorial de los tratamientos. La unidad experimental estuvo constituida por cada uno de los explantes evaluados. La variación entre los tratamientos fue analizada aplicando análisis de varianza (ANOVA). Cuando el ANOVA indicó diferencias entre las medias de los tratamientos, se aplicó el Test Duncan para determinar si los tratamientos presentaron diferencias significativas, con $\alpha = 0.05$, para las variables evaluadas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Establecimiento a partir de semillas de *M. frondosus*

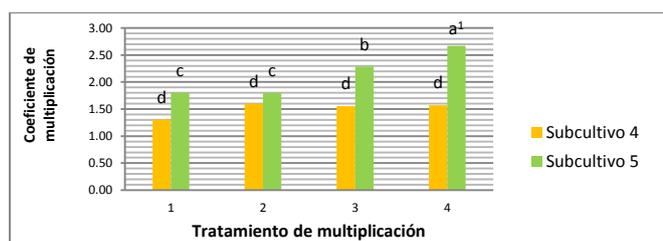
En el tratamiento de desinfección de semillas con 1 % de hipoclorito de sodio, el porcentaje de desinfección fue de: 36 % de las semillas tratadas, las cuales no germinaron, y el 64 % restante se contaminó con hongos. En las semillas tratadas con 3 % de hipoclorito de sodio, se logró un 6,5 % de semillas germinadas *in vitro*; si bien un 12,4 % de las mismas presentaron contaminación con hongos, porcentaje menor al tratamiento 1, el 80,4 % de semillas de este tratamiento mostraron contaminación con bacterias endógenas. Las bacterias endógenas no se observaron en el tratamiento 1 debido a la alta tasa de contaminación fúngica que se presentó.

Se observó que con 3 % de hipoclorito de sodio se logró una mejor limpieza de las semillas, la extracción de la cubierta seminal, restos de fruto y aceites presentes, con lo cual facilitó la germinación de las mismas, no siendo así en el tratamiento al 1%, en el cual las semillas quedaron con una cubierta seminal adherida que impidió la germinación.

Multiplicación a partir de plántulas *in vitro* de *M. frondosus*

Tras efectuar el análisis de varianza (ANOVA) para la variable coeficiente de multiplicación, no se observan diferencias significativas entre los tratamientos evaluados en el subcultivo 4. En cambio, en el subcultivo 5 se observan diferencias significativas entre los tratamientos; los mejores resultados se obtuvieron con el tratamiento 4 (1 mg/L 6-BAP y 0,1 mg/L ANA) con un coeficiente de multiplicación de 2,66, seguido del tratamiento 3 (0,5 mg/L 6-BAP y 0,1 mg/L ANA) con un coeficientes de 2,29 (figura 1).

Figura 1. Coeficiente de multiplicación de brotes de *M. frondosus*.



¹ Tratamientos identificados con letras iguales, en el mismo subcultivo, indican que no son significativamente distintos dado $\alpha=0.05$ según comparación múltiple de medias de Duncan, para la variable Coeficiente de multiplicación.

Como se ha descrito en la bibliografía para muchas especies leñosas, y como refiere Mroginski *et al.* (2004) se observó que el regulador de crecimiento 6-BAP promueve significativamente la proliferación y diferenciación de brotes. Además, se observó que los brotes obtenidos en los medios suplementados con las mayores dosis de 6-BAP (tratamiento 3 y 4) presentaban mejores condiciones en cuanto a color de hojas y desarrollo de los entrenudos.

CONCLUSIÓN

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos se arribaron a las siguientes conclusiones: el mayor porcentaje de explantes de Incienso se logra a partir de la germinación de semillas desinfectadas con una solución de hipoclorito de sodio al 3 % durante 15 minutos. El mayor número de brotes en la fase de multiplicación *in vitro* se obtuvo con medio de cultivo MS completo suplementado con 1 mg/L de 6-BAP y 0,1 mg/L ANA.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CORVALHO P.E.R., 1982. Resultados experimentais de especies madeireiras nativas no Estado do Parana. En Anais do Congresso Nacional sobre essencias nativas. Silvicultura em Sao Paulo. Vol. 16 A. parte 2. Editorial especial Revista Do Instituto Florestal Sao Paulo Brasil. Pp. 747 y 765.
- EIBL, B.; BOHREN A., MENDEZ R., SOSA G., DI STASI M., 2002, Pecom Forestal SA/FCF, UNaM. Especies forestales nativas de la selva paranaense, Fichas de divulgación: Ficha 19 de 30 y anexos.
- JIMÉNEZ GONZÁLES, E. 1998. Generalidades del Cultivo *in vitro*; Propagación y mejora de plantas por Biotecnología; Pérez Ponce J. (ed.); p. 13-24.
- LORENZI, H.; 1999, Árvores Brasileiras, Manual de Identificación y Cultivo de Plantas Arbóreas del Brasil, Vol.1, 2º Edición; Instituto Plantarum De Estudos Da Flora LTDA.
- MROGINSKI, L.; SANSBERRO, P.; FLASCHLAND, E. 2004. Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales. Biotecnología y Mejoramiento Vegetal. Echenique, V.; Rubinstein, C. y Mroginski L. (eds); Ediciones INTA, RA.; II 2:35-42.
- MURASHIGE T. Y SKOOG F. 1962. Arevised medium for rapid growth and bioassays with tabacco tissue. Phys Plant. 15: 473-493.
- TEXEIRA J.B., 1993. Limitações ao prossesos de cultivo *in vitro* de especies lenhosas EMBRAPA. Recursos genéticos e Biotecnología. Brasília, Brasil.

Viabilidad de polen en arveja (*Pisum sativum* L.)

Amelia W. HUARINGA JOAQUÍN¹, Elías H. HUANUQUEÑO COCA¹ Félix CAMARENA MAYTA¹ y Raúl BLAS SEVILANO¹

¹Universidad Nacional Agraria La Molina, Docentes del Departamento de Fitotecnia, Facultad de Agronomía; ahuarina@lamolina.edu.pe

RESUMEN

En la presente investigación se estudió la viabilidad del grano de polen de arveja en cinco variedades (Quantum, Usui, Utrillo, Remate y Churcampa) en condiciones de La Molina. Se consideró cinco estadios del botón floral T1 Botón muy pequeño, T2 Botón con pétalo poco visible, T3 Botón floral con pétalos tamaño medio, T4 Botón con pétalos por abrirse y T5 Flor recién abierta. En todas las variedades de arveja se observó un menor porcentaje de la viabilidad del grano de polen cuando el botón es muy pequeño (t1) de 1,2 cm de longitud y 0,4 cm de ancho y cuando la flor es recién abierta. En las variedades Quantum y Utrillo se puede obtener granos de polen viables en cualquiera de las tres fases de desarrollo floral T1, T2 y T3. En las variedades Usui, Remate y Churcampa solo en la fase 3 (T3) se encontró granos de polen viables. La fase de desarrollo floral 3 es la fase en la que las cinco variedades de arvejas mostraron granos de polen viables superiores al 69%. Este resultado permitió realizar las cruces entre las variedades de arveja en el programa de mejoramiento que conduce el Programa de Investigación y Proyección Social de Leguminosas de Grano y Oleaginosas de la Universidad Nacional Agraria La Molina.

ABSTRACT

In this research the viability of the pollen grain pea was studied in five varieties of pea (Quantum , Usui, Utrillo, Remate and Churcampa) under or in La Molina. Five stages of flower bud were the treatments: T1 Flower bud very small, T2 Flower bud with inconspicuous petal floral, T3 Flower bud with medium sized petals, T4 Flower bud with petals opening slightly and T5 Newly opened flower . In all varieties of peas a smaller percentage of pollen grain viability was observed when flower bud is very small (T1) of 1.2 cm long and 0.4 cm wide and when it is freshly opened flower(T5). In the Quantum and Utrillo varieties can obtain viable pollen grains in each of the three stages of floral development T1, T2 and T3. In Usui, Remate and Churcampa varieties only in phase 3 (T3) of viable pollen grains was found. The floral development phase 3 is the phase in which the five varieties of peas showed viable pollen grains greater than 69%. This result allowed for the crosses between varieties of pea in the breeding program of the Legume Program at the Agrarian National University La Molina.

INTRODUCCIÓN

En el Perú la arveja se siembra mayoritariamente para grano seco en la zona altoandina y la superficie cosechada para el 2011 fue 48 947 has. mientras que para arveja grano verde se registró 27 285 has., con un rendimiento promedio de 3 656 kg/ha. (FAO, 2012). Los productores de la zona andina siembran variedades criollas y algunas variedades mejoradas (Agronegocios génesis), cuyo precio es muy elevado. La formación de nuevas variedades de arveja tipo americana puede realizarse mediante la hibridación y tener una alta eficiencia en la hibridación es muy importante y depende de elegir el momento óptimo del botón floral en el progenitor masculino y contar con granos de polen viables en un alto porcentaje para tener éxito en la polinización y fecundación y obtención de la semilla F1 y a través del manejo de las poblaciones segregantes, identificar las recombinaciones de los caracteres buscados en las progenies.(Huarina, 2011). La calidad de los granos de polen determinan la calidad de las semillas, por ellos un estudio de viabilidad de polen conllevan cada vez al éxito en la hibridación entre las variedades de arveja, es decir, la elección del momento óptimo de los progenitores masculino y femenino.

Objetivo: Determinará la cantidad de granos de polen viables por cada estadio del botón floral en cinco variedades de arveja.

MATERIALES Y METODOS

La colecta de los botones florales y flores de las variedades de arveja Usui, Remate, Churcampa, Rondo y Utrillo se hizo en horas de la mañana en el campo experimental Libres I de la Universidad Nacional Agraria La Molina bajo condiciones ambientales óptimas, Gonzales et al (2002) y Gritton (1980) y el estudio de viabilidad del grano de polen se realizó en el Laboratorio del Instituto de Biotecnología (IBT) de la UNALM. El método que se utilizó para estimar la viabilidad del polen fue la tinción, utilizando como colorante la orceína (Guerrero, 2005).

Las muestras de los botones florales en los cinco estadios o fases se colectaron a las 8:00 am en placas petri y se trasladaron al laboratorio. Se identificaron el porta objeto con el tratamiento evaluado y la repetición indicada. La lectura en la muestra se hizo en el microscopio Karl Zeiss a 200x utilizando cinco campos ópticos por muestra. El procedimiento se repitió tres veces para cada estadio de la flor en cada variedad de arveja. Se evaluaron los granos de polen totales y granos de polen de polen en solo tres estadios o fases del botón floral en cada una de las variedades de arveja. Los datos de viabilidad de granos de polen fueron sometidos al análisis de la varianza de un diseño completamente aleatorizado, previa comprobación de los supuestos del análisis. Al detectarse diferencias significativas entre los tratamientos se realizaron pruebas de comparaciones múltiples de medias de acuerdo a Duncan a un nivel de significación del 5%, se utilizó el Statistic Analysis System 6.12, como programa estadístico.

RESULTADOS Y DISCUSION

Las variedades de arveja precoces iniciaron la floración a los 45 días (Remate y Quantum), a los 55 días para la variedad Rondo y 65 días para la variedad Utrillo mientras que las variedades Usui y Churcampa iniciaron la floración a los 70 días. El análisis de variancia de tres fases del botón floral en cinco variedades de arveja, que se presenta en la Tabla 1, se observó que existen diferencias estadísticas altamente significativas en el porcentaje de granos de polen viables en promedio de tres fases de desarrollo floral para los genotipos de arvejas Usui, Remate y Churcampa, sin embargo, no se detectaron diferencias en las variedades de arveja Quantum y Utrillo.

Tabla 1. Cuadrados medios del análisis de variancia para granos de polen viables (%) evaluados en tres fases de desarrollo floral y en cinco genotipos de arvejas.

Fuentes de Variación	G.L.	CUADRADOS MEDIOS				
		QUANTUM	USUI	UTRILLO	REMATE	CHURCAMP
Fase de desarrollo floral	2	11.04	4777.1**	3818.84	6655.32**	8100**
Error experimental	6	15.67	119.1	1258.34	437.22	0
C.V. (%)		4.55	47.36	105.29	56.55	0
Promedio (%)		86.97	23.03	33.69	36.97	30

*Significación al 5 % de probabilidad

**Significación al 1 % de probabilidad

La fase de desarrollo floral 3 es la fase en la cual las cinco variedades de arvejas mostraron granos de polen viables superiores al 69%.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRONEGOCIOS GÉNESIS. Catálogo de productos. Disponible en: http://www.agrogenesis.com/cat_variedades?v=2.

FAOSTAT. 2012. Estadística Perú 2010. <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>

González, M. E.; Estévez, A.; Castillo, J.; Salomón, J.; Moré, O. y M. M. Hernández. 2002. La Calidad del Polen: Requisito Indispensable del Mejoramiento Tradicional de la Papa en Cuba. Revista Latinoamericana de la Papa. Vol 13:75-94 en : <http://www.papaslatinas.org/v13n1p75.pdf>

GRITTON, E.T. 1980. Field Pea. Hybridization of Crop Plants. p. 347-356. In: W.R. Fehr and H.H. Hadley (eds.), American Society of Agronomy, Inc., and Crop Science Society of America, Inc., Wisconsin, USA.

GUERRERO, V.(2005) Polinización y Otros Aspectos de la Misma en Manzano. Disponible en: <http://www.ciad.mx/boletin/marabr05/articulo.pdf>

HUARINGA, J.A. 2011. Informe del Proyecto Educativo: Fortalecimiento de las capacidades y habilidades orientadas a la investigación: Caso Hibridación y selección en leguminosas de grano. 23 p.

Análisis de la variabilidad genética del olluco (*Ullucus tuberosus*) de la región cajamarca, Perú.

Alex Portilla¹, Joel Flores¹, Daniel Huamán¹, Raúl Blas¹, Andrew Riseman² & Eduardo Jovel²

¹Universidad Nacional Agraria La Molina, ²University of British Columbia, Canadá

alxp2712@hotmail.com, rblas@lamolina.edu.pe,

RESUMEN

En Perú el olluco es importante para la alimentación debido a su alta calidad nutricional para la población local. Se determinó la diversidad genética de las 43 entradas de olluco coleccionadas en la región de Cajamarca mediante descriptores morfológicos y moleculares (AFLP). En la caracterización morfológica se identificaron 25 morfotipos, lo que indica un 40% de duplicados. En el análisis molecular el porcentaje de polimorfismo es de 40% y el análisis de agrupamiento no muestra ninguna duplicación. Estos resultados indican, una variabilidad baja tanto molecular como morfológica en los ollucos cultivados en la región Cajamarca.

Genetic variability analysis of olluco (*Ullucus tuberosus*) from Cajamarca region, Peru.

ABSTRACT

In Peru, olluco is an important highly nutritious food for local farmers. Genetic diversity of collected accessions from the Cajamarca region was determined by morphological and molecular (AFLP) descriptors. In the morphological characterization, 25 morphotypes were identified, indicating 40% duplication in the collection. Molecular analyses show 40% polymorphism with the cluster analysis showing no duplication. These results indicate a low level of variability is present in ollucos grown in the Cajamarca region.

INTRODUCCION

El olluco, después de la papa es el tubérculo más apreciado por los consumidores de las grandes ciudades de la costa. La formación de frutos y la producción de semillas son muy raras y escasas (Sperling, 1988). El cultivo de olluco presenta problemas tales como susceptibilidad a virus, largo tiempo de maduración bajo rendimiento comparado con otras tuberosas andinas como la mashua y la oca. El lugar de origen del olluco, aún no está definido, pues se han observado plantas consideradas como silvestres en lo largo de los andes, que son tubérculos amargos no comestibles. El olluco por ser un cultivo rústico se ha adaptado a condiciones de frío extremo y es tolerante a la sequía (Pietila, 1991) pero no a los períodos con excesiva lluvia, probablemente porque éstas están acompañadas por una marcada reducción en la luminosidad que afecta a la fotosíntesis (Castillo y Tapia 1990). Debido a que este cultivo estaría sufriendo un serio problema de erosión genética es necesario desarrollar estrategias eficientes para conocer la diversidad genética, la conservación y su utilización adecuada. De aquí radica la importancia de la caracterización morfológica en las comunidades campesinas de la región Cajamarca y su caracterización molecular, que servirán para determinar la variabilidad genética de esta especie que ayuden a generar estrategias de su conservación y utilización en la región.

METODOLOGÍA

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Biotecnología (IBT) de la Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM). El material vegetal utilizado proviene de los agricultores de Cajamarca, se analizó un total de 43 accesiones. La caracterización morfológica fue mediante la utilización de descriptores morfológicos estándar (IPGRI / CIP 2003). Por otro lado, la caracterización molecular fue utilizando la técnica Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP). La extracción de ADN se realizó a partir de los folíolos tiernos y frescos, según el método CTAB (Bromuro de hexadecil trimetil amonio) a pequeña escala, según el protocolo de Doyle y Doyle (1990). Los marcadores AFLP son generados siguiendo el procedimiento descrito en el Manual AFLP® Analysis System I versión B, con algunas modificaciones, para optimizar la cantidad de reactivos (Vos *et al.*, 1995).

Análisis estadístico

Los datos de caracterización morfológica fueron analizadas usando la técnica de agrupamiento. Por otro lado, la evaluación de las bandas polimórficas se registró como la presencia o ausencia de las bandas en toda la población. Se creó un registro de datos binarios en hojas de cálculo Microsoft Excel versión 7, conteniendo los registros, donde cada banda de ADN se consideró como un locus individual, con dos posibles alelos: presencia de la banda (1) y a la ausencia (0), para cada fragmento de interés generado por cada primer usado. Mientras que para las bandas dudosas se les asignó un valor de (9). Estos datos fueron utilizados para el análisis de agrupamientos, según los coeficientes de similitud (simple matching) usando el programa NTSYS-pc versión 2.2 (Rohlf, 2001).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La caracterización morfológica permitió identificar 25 morfotipos, lo que significa un 40.5% de duplicados. El color predominante de la superficie del tubérculo varía desde verde amarillento a rosado claro predominando el color amarillo oscuro (26.2%), el 64.3% no presenta un color secundario en el tubérculo. Se presentó un elevado porcentaje de quimeras (71.4%), la forma general del tubérculo es redonda (80.95%). En el agrupamiento de 42 accesiones de olluco podemos observar a un coeficiente de similitud de aproximadamente 0.5 la formación de 18 grupos relacionados por el color del tubérculo (Figura 1).

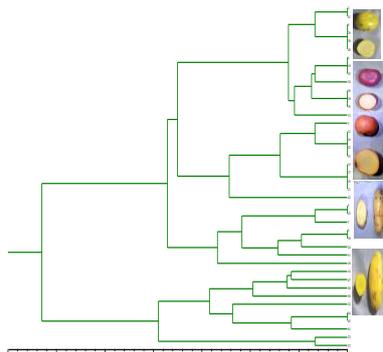


Figura 1. Dendrograma según la caracterización morfológica de 42 accesiones de olluco.

En la caracterización molecular se determinó el número de bandas polimórficas por primer, obteniéndose un máximo de 25 y un mínimo 11 marcadores polimórficos. Los iniciadores elegidos amplificaron un total de 470 bandas, de las cuales 188 fueron polimórficas. Esto representa un 40 % de polimorfismo. Los pares de combinación de iniciadores (E12-M32, E13-M32, E13-M35, E45-M41, E37-M40, E32-M32, E45-M35, E12-M41, E12-M35, E13-M41), mostraron la mejor definición y reproducibilidad de las bandas del total que fueron leídas como presencia y ausencia. En la figura 3, se aprecia el dendograma obtenido para las 43 accesiones estudiadas, como parte del avance de la caracterización molecular. Con un coeficiente de similitud de 0.9 se determinan 39 genotipos, lo que indicaría solamente un 9.3% de duplicados, es decir una alta variabilidad genética de ollucos cultivados, a un coeficiente de 1 no se muestra duplicación, estos resultados contradicen a los autores que afirman que la variabilidad genética de olluco es baja debido a su propagación vegetativa.

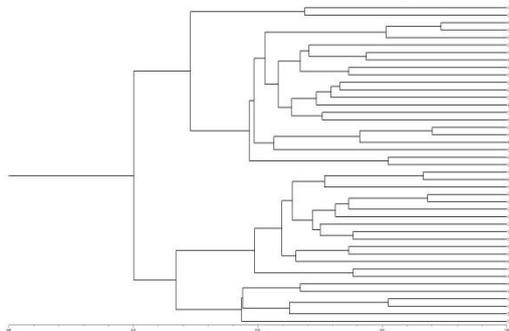


Figura 3. Dendograma de similitud para 43 accesiones de olluco de Cajamarca

CONCLUSIONES:

Se encontró alta variabilidad a nivel morfológico en las poblaciones de olluco cultivadas, en las que se definieron un total de 25 morfotipos.

En el análisis de frecuencias se hace evidente el alto porcentaje de Variegación del tubérculo (71,43%).

La técnica de AFLP permitió la identificación de marcadores polimórficos en las 43 accesiones de olluco con un total de 40% de polimorfismo.

La caracterización molecular permitió diferenciar a un nivel de similitud de 0.9, 39 genotipos, es decir un 9.3% de duplicados y aun coeficiente de 1, 43 genotipos. Lo que indica una alta variabilidad genética de los ollucos cultivados de la región Cajamarca.

Agradecimiento: El presente trabajo fue financiado por el proyecto AGROECO, con fondos del Programa Canadiense de Investigación Internacional en Seguridad Alimentaria (CIFSRF).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Castillo, R. y Tapia, B. 1990. Ulluco/melloco (*Ullucus tuberosus* Caldas). INIAP. Quito (Ecuador)
- Doyle JJ, Doyle JL (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 12: 13-15
- Pietila, L. 1991. Investigaciones sobre Ulluku. Abo Akademis Kopieringscentral. Turku (Finlandia).
- Rohlf. 2000. NTSYS-pc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, version 2.2. New York: Exeter Software.
- Sperling, C. 1988. Domesticación y evolución de *Ullucus tuberosus* Caldas. En: VI Congreso Internacional sobre Cultivos Andinos. INIAP. Quito (Ecuador). Pp. 214-217.
- Vos, P; Hogers, R; Bleeker, M; Reijans, M; Van De Lee, T; Hornes, M; Frijters, A; Pot, J; Peleman, J; Kuiper, M; Zabeau, M. 1995. AFLP: A new technique for DNA Fingerprinting. Nucleic Acids Research 23:4407-4414.

Avances del análisis de la diversidad genética de las ocas cultivadas (*Oxalis tuberosa* Mol.) de cajamarca-perú, usando marcadores microsatélites.

¹Romina Camacho, Eduardo JOVEL² Andrew RISEMAN², & Raúl BLAS SEVILLANO¹

¹Facultad de Agronomía, Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM), Lima, Perú; ²University of British Columbia, Canadá

¹romina.camachoa@gmail.com, ²rblas@lamolina.edu.pe

RESÚMEN

Se está analizando 146 accesiones de oca usando 19 *loci* microsatelites (SSR), con el objetivo de estimar la diversidad genética existente en el departamento de Cajamarca. Resultados preliminares muestran una alta variabilidad alélica en los *loci* analizados al momento, variando de 5 a 10 alelos por locus.

Progress on genetic diversity analysis of cultivated oca (*Oxalis tuberosa* mol.) from Cajamarca-Peru, using microsatellite markers.

ABSTRACT

We analyzed 146 accessions of oca, using 19 microsatellites (SSR) loci, in order to estimate the genetic diversity in the department of Cajamarca. Preliminary results show a high level of allelic variability, varying between 5 and 10 alleles per locus.

INTRODUCCIÓN

Oxalis tuberosa Mol. (Oca) de la familia Oxalidaceae (Ferreya, 1986), es una especie nativa de los Andes. Es después de la papa el tubérculo con mayor área de cultivo e importancia en los Andes Sudamericanos por su rendimiento y sabor agradable. El valor nutritivo de la oca es muy variable, pero igual o mejor que la papa. Su contenido de proteína varía pero generalmente está por encima del 9% en la materia seca y con buena proporción de aminoácidos esenciales (Collazos, 1975). La oca presenta una alta resistencia a los principales factores ambientales adversos que afectan a los cultivos, y próspera en climas fríos moderados donde las poblaciones de insectos son mínimas así como el desarrollo de enfermedades. También son resistentes al déficit de humedad y puede soportar suelos salinos en los que otros cultivos no prosperan adecuadamente (Mujica, 2009). Por estas razones la oca, tiene un gran potencial en el futuro para poder conquistar terrenos marginales para la producción de alimentos.

En el presente trabajo se realizará la caracterización molecular con el objetivo de identificar la diversidad genética de oca de esta región para promover su conservación, utilización en los programas de mejoramiento y producción sostenible del cultivo.

MATERIALES Y MÉTODOS

1.1. Material genético

Se analizarán 146 accesiones de oca cultivada provenientes de 5 provincias de la región de Cajamarca

1.2. Extracción de ADN

La extracción de ADN se realizó mediante el método de CTAB a partir de tejido foliar joven de *Oxalis tuberosa* Mol. de acuerdo a la metodología propuesta por Doyle y Doyle en 1990. Posterior a la extracción se resuspendió el ADN en 70µl de buffer T10E0,1, se colocaron las muestras 15 minutos en baño maría y se procedió a agregar 2µl de ARNasa dejandolas a 37°C por un tiempo de 3 horas.

1.3. Prueba de Calidad de ADN y dilución

La calidad de ADN de las muestras extraídas se realizó en gel de agarosa 1%, la migración se hizo en cámara de electroforesis horizontal a 80 [V] en un tiempo de 60 minutos y se comparó visualmente con el marcador λ/Pst-I (Genoma del bacteriófago λ digerido con enzima Pst-I). También se realizó la cuantificación de las muestras en espectrofotómetro y su posterior dilución a 15 ng/µl para ser usada como muestra de trabajo.

1.4. Reacción en cadena de la polimerasa

La reacción de amplificación se está realizando con 19 pares de iniciadores tipo microsatelites (SSR) desarrollados para oca por un grupo de investigadores de la universidad de BYU (USA)⁴. Hasta el momento se ha logrado amplificar mediante una PCR convencional (Temperatura específica) 50 accesiones de oca con 6 iniciadores. La Tabla 1 muestra las concentraciones y volúmenes del mix de PCR. Los iniciadores restantes serán amplificados con una PCR touchdown debido a la inespecificidad de los productos con una PCR convencional.

1.5. Electroforesis en Gel de acrilamida

Los productos amplificados de las pruebas fueron visualizados en geles de poli(acrilamida) 6% bajo el sistema de electroforesis vertical de

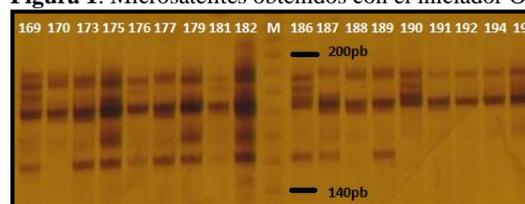
BioRad Sequi-Gen GT sequencing Cell adaptados para las condiciones del laboratorio.

La figura 1 muestra las regiones microsatélites obtenidas con el iniciador OT0585 en una PCR convencional a 58°C de temperatura de unión.

⁴ Comunicación personal Dr. Jorge Rojas-Beltrán.

TABLA 1. Componentes de PCR.

[final]	Componente	µl
	Agua	4.6
10X	PCR Buffer	1
25 mM	MgCl ₂	1
5 nM	DNTP	0.4
10 µM/µl	Primer F	0.4
10 µM/µl	Primer R	0.4
0,08 U/µl	Taq polimerasa	0.2
15 ng/µl	DNA	2

Figura 1. Microsatélites obtenidos con el iniciador OT0585.

1.6. Análisis de datos

El perfil de polimorfismo de las 50 accesiones de oca fueron registrados por presencia (“1”) y ausencia (“0”) de las bandas producidas. La matriz binomial resultante fue analizada, usando técnicas de agrupamiento con el programa estadístico NTSYS versión 2.2 (Rohlf, 1998), según el algoritmo UPGMA (Unweight Pair-Group Method with Arimethmetic Means).

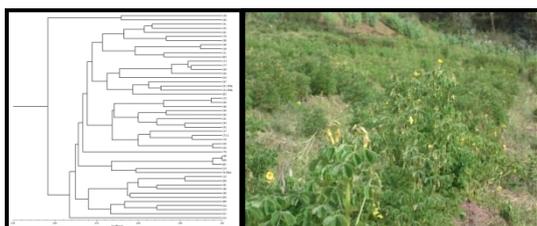
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Al analizar las 50 entradas de oca se observa una alta variabilidad alélica, que va de 5 a 10 alelos por *locus* (Tabla 2), lo que indica una larga historia evolutiva en la región. En el dendograma generado (figura 2) para las 50 accesiones a un coeficiente de similitud de 1 se encontró dos accesiones duplicadas. A un coeficiente de similaridad de 0.75 se forman 15 grupos en donde se observa tendencias de agrupamiento de acuerdo algunos caracteres morfológicos como la coloración de los tubérculos. Sin embargo vemos que a un coeficiente de similaridad de 0.92 dos de las entradas (177 y 189) que comparten la coloración roja del tubérculo se agrupan.

TABLA 2. Tamaño y número de alelos registrados para cada *loci*.

<i>Loci</i>	n° Alelos	Pares de bases (pb)
OT07970	9	No estimado
OT12024	9	No estimado
OT05385	6	193-151
OT22713	6	210-184
OT11876	5	203-180
OT04178	10	173-133

A pesar de que existen características morfológicas y de procedencia diferentes en algunos de los grupos formados, se encuentran genotípicamente relacionados. Hay que indicar que estos resultados son preliminares puesto que aún falta probar 13 iniciadores para el total de la población (150).

**Figura 2.** a. Dendograma que agrupa 50 entradas de oca para seis marcadores microsatélites, b. Plantación de oca.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Collazos, C. 1975. La composición de los alimentos peruanos. 5 Ed. INS (Instituto Nacional de Salud). Lima, Perú.
- Ferreira, R. 1986. Flora del Perú (Dicotiledóneas). Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú. 188 p. Editorial Imprenta Sudamérica.
- Mujica, A. 2009. Potencialidades de los cultivos andinos en el desarrollo nacional y su riqueza nutricional y cultural. Thaki (Revista de Investigación, Análisis y Propuesta). 7:19-26.

Enraizamiento de brotes de caoba (*Swietenia macrophylla* King.), en la Amazonía Peruana

Geomar Vallejos Torres¹, Luis E. Toledo Gonzales-Polar², Luis. A. Arévalo López³, Henry Ruiz Solsol⁴,
Christian Koch Duarte⁵

¹ Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana. gvallejos@iiap.org.pe

² Reforesta Perú S.A.C. etoledo@reforestaperu.com.pe

³ Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana. larevalol@iiap.org.pe

⁴ Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana. hruiz@catie.ac.cr

⁵ Reforesta Perú S.A.C. koch_7poz@hotmail.com

RESUMEN

Se evaluó el enraizamiento de brotes de *Swietenia macrophylla*, bajo el efecto de tres medios de enraizamiento (arena media, jiffys y al aire libre) y dos dosis de ácido indolbutírico (3000 y 6000 ppm), utilizando microtúneles como ambientes de enraizamiento. El estudio se realizó gracias al convenio de Reforesta Perú S.A.C y el Instituto de Investigaciones de la Amazonia Peruana (IIAP), con el soporte financiero del Fondo para la Innovación Ciencia y Tecnología (FINCyT). Al término de 32 días, los brotes sembrados con dosis de AIB de 3000 ppm mostraron enraizamientos de 85.97 %, haciendo uso de pellets - jiffys como sustrato.

ABSTRACT

Rooting of shoots of *Swietenia macrophylla*, under the effect of three rooting media (medium sand, jiffys and outdoor) and two doses of indole butyric acid (3000 and 6000 ppm), using greenhouses as rooting environments was evaluated. The study was done with the agreement of Reforesta Peru SAC and Research Institute of the Peruvian Amazon (IIAP), with financial support from the Fund for Innovation, Science and Technology (FINCyT). Following 32 days, the shoots seeded at doses of 3000 ppm showed AIB embeddedness of 85.97%, using pellets - jiffys as substrate.

INTRODUCCIÓN

La viabilidad de la semilla de caoba (*Swietenia macrophylla*) en el momento de la dispersión es generalmente del 90%, sin embargo esta viabilidad se pierde muy rápidamente en el transcurso de los días si no se los almacena en condiciones óptimas de humedad y temperatura, por lo que hace necesario disponer de otros mecanismos de producción de plantas. Con base en lo mencionado, en este ensayo se evaluó el efecto de tres medios de enraizamiento y tres dosis de ácido indol-3-butírico sobre la capacidad de enraizamiento de caoba, haciendo uso de microtúneles, como estrategia sostenible de multiplicación clonal de esta especie a escala comercial.



Brote enraizado

MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación del experimento

El ensayo se llevó a cabo entre los meses de mayo a noviembre de 2013, en el área de propagación del vivero de la empresa REFORESTA PERU S.A.C; ubicado en el distrito de la Banda de Shilcayo, provincia y departamento de San Martín; Perú; con coordenadas UTM: N 9280755 y E 351994 a una altitud de 325 m.s.n.m., con temperaturas promedio de 25.44 °C y una precipitación de 72.3 mm/mes (IIAP 2013).

Origen y colecta de los brotes

El material vegetativo (brotes) de *S. macrophylla* se obtuvo de los patrones instalados en el jardín clonal de multiplicación clonal con características sobresalientes en rectitud, sanidad, tipo de copa y calidad de fuste.

Preparación y aplicación hormonal en brotes a base de ácido indol-3-butírico (AIB)

La dosis hormonal se preparó a partir del ácido indol-3-butírico (AIB) químicamente puro, diluido en alcohol al 96 %, para obtener la concentración deseada de 3000 y 6000 ppm. Una vez preparada la hormona, se procedió a sumergir 2 cm de la base del brote mediante el método de inmersión rápida, seguidamente se establecieron en las cámaras húmedas.

Sustrato y establecimiento de los ensayos

Se utilizó medios de enraizamientos en base a arena media, al aire libre y jiffys, . Finalmente estas fueron depositadas en los microtuneles para su enraizamiento.

Diseño experimental

Se aplicó el Diseño Completamente al Azar (DCA) con arreglo factorial de 3A x 2B con 6 tratamientos, tres repeticiones y 6 estaquillas por unidad experimental. Los datos fueron convertidos a la función $\arcsen \sqrt{\%}$, para el porcentaje de enraizamiento, con un nivel de significancia de $p < 0,05$ de probabilidad de error para determinar la naturaleza de las diferencias entre tratamientos (DÍAZ, 1991). Los datos fueron sometidos a la prueba Tukey con un nivel de significancia de ($p < 0,05$) de probabilidad de error para determinar las naturalezas de las diferencias entre los tratamientos. Los datos se almacenaron y analizaron en el software SPSS v. 22.

Suministro de riego y control fitosanitario en los microtúneles

Se proporcionó riego nebulizado en el interior del microtúnel, durante 3 minutos por cada hora, para mantener la humedad relativa en rangos mayores al 80%. Se considera la aplicación de fungicida agrícola Carbendazim (500 g/l), Thiophonate methyl 500 g/kg y Kasugamicina (20 g/l) para prevenir la propagación de patógenos, realizándose esta actividad una vez a la semana.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Después de 32 días, los resultados no mostraron una interacción significativa entre el sustrato y la dosis de AIB ($p = 0,605$), para la variable número de raíces (Cuadro 1). Sin embargo, el tipo de sustrato y la dosis de AIB, como efectos principales, mostraron diferencias significativas para la variable cantidad de raíces ($p = 0,001$ y $0,010$, respectivamente), encontrándose mayor cantidad de raíces en brotes con sustrato jiffy, así como en dosis 3000 ppm.

Cuadro 1. Efecto del tipo de sustrato y la dosis AIB en el número de raíces (media \pm error estándar).

Sustrato /Dosis	Dosis de AIB (ppm)	
	3000	6000
Jiffy	2.22 \pm 0.04 Aa	1.96 \pm 0.07 Aa
Arena	2.03 \pm 0.01 Aa	1.85 \pm 0.03 Aa
Libre	1.52 \pm 0.06 Bb	1.41 \pm 0.01 Bb

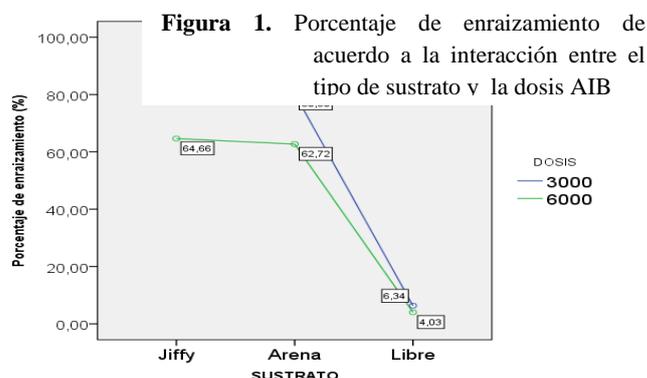
Nota: Letras en mayúscula para el factor “tipo de sustrato” y minúsculas para el factor “dosis de AIB”.

Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Tukey ($p > 0,05$)

Para la variable porcentaje de enraizamiento, los resultados mostraron una interacción significativa entre el tipo de sustrato y la dosis de AIB ($p = 0,000$), encontrándose mayor porcentaje de enraizamiento en brotes con sustrato jiffy y en dosis 3000 ppm. Como se observa en la Figura 1, mejores rendimientos en porcentaje de enraizamiento de estaquillas de caoba (*Swietenia macrophylla*) se presentaron en la dosis 3000 ppm aplicados en combinación con tres medios de enraizamiento, generando un 85,97 % de enraizamiento. Basados en la dosis hormonal, se observó la disminución del porcentaje de enraizamiento de acuerdo al incremento de la dosis AIB, el descenso se da como resultado de desórdenes fisiológicos que ocurren en las estacas debido a dosis excesivas o inclusive a menores cantidades de concentración de dosis de AIB (Mesén 1998).

Vallejos (2011) obtuvo 100% de enraizamiento en estacas de *Plukenetia volubilis* con áreas foliares de 50 y 100 cm² debido a que estas áreas foliares favorecieron una mayor fotosíntesis y con ello un mayor porcentaje de enraizamiento. Díaz (1991) con estaquillas de *C. odorata* encontró que el área foliar de 100 cm² es superior en número de raíces por estaquilla a las de 50 y 25 cm² en 12% y 50%, respectivamente. Mesen (1998) menciona que la presencia de hojas en la estaquilla, ejerce una fuerte influencia, estimulando la iniciación de raíces, gracias a que constituye fuente de asimilados, auxinas y otras sustancias.

Leakey y Mesén (1991) en experiencias con otras especies tropicales, evidencian que la temperatura óptima del aire que favorecen al enraizamiento es de 20 a 25°C, aunque temperaturas hasta 30°C son aceptables siempre y cuando se mantenga una humedad relativa cercana al 95%



Ruiz (2010) la propagación vegetativa de sachá inchi (*Plukenetia volubilis*) le resultó relativamente sencilla y exitosa, con estaquillas intermedias o basales de 8 cm de longitud, con áreas foliares de 50 cm² y tratadas con ácido indolbutírico (AIB) en dosis de 0,15% o 0,20%.

CONCLUSIONES

Se determinó que la dosis óptima para la propagación vegetativa de caoba (*Swietenia macrophylla*) es de 3000 ppm de AIB en cuanto a la variable número de raíces y porcentaje de enraizamiento. El sustrato óptimo para la propagación vegetativa de caoba (*Swietenia macrophylla*) en cuanto a la variable número de raíces y porcentaje de enraizamiento es el uso de jiffys. Se concluye que el mayor porcentaje de enraizamiento para la especie caoba (*Swietenia macrophylla*) es 85,97 %, resultado que es generado a partir de la combinación de jiffy con 3000 ppm, a los 32 días de su instalación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Díaz, M. 1991. Técnicas de Enraizamiento de estacas juveniles de *Cedrela odorata* L. y *Gmelina arborea* Linn. Tesis Mag. Sci. Turrialba, Costa Rica CATIE. 93 p.
- IIAP. 2013. Estación Meteorológica: Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana- San Martín, Banda de Shilcayo, San Martín, Perú.
- Leakey, R.R.B.; Mesén, F. 1991. Métodos de Propagación Vegetativa en Árboles Tropicales: Enraizamiento de Estacas Suculentas. CATIE, Turrialba. Costa Rica. p 113 -133.
- Mesén, F. 1998. Enraizamiento de estacas juveniles de especies forestales: Uso de propagadores de sub-irrigación .CATIE. Turrialba, Costa Rica. 36p.
- Mesén, JF. 1993. Vegetative propagation of Central American hardwoods Thesis Ph.D Scotland, University of Edinburgh. p. 231.
- Ruiz, H. 2010. Efecto del ácido indolbutírico y tipo de estaquilla en el enraizamiento de sachá inchi (*plukenetia volubilis* L.). Agronomía Costarricense 34(2): 259-267. ISSN:0377-9424 / 2010.
- Vallejos, G. 2011. Propagación vegetativa del sachá inchi (*Plukenetia volubilis* L.) mediante enraizamiento de estacas juveniles en cámaras de subirrigación en la amazonia peruana. Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana. Folia Amazónica, Tarapoto-San Martín. Vol. 20 N° 1-2 2011: 95 – 100.

Determinación del estado floral de la tuna (*Opuntia ficus-indica* Mill.) para la polinización manual en los valles interandinos

¹Juan Ignacio Tineo Canchari

¹Programa Nacional de Investigación en Recursos Genéticos. Estación Experimental Agraria Canaán, INIA-Ayacucho. jtineo2002@yahoo.es

RESUMEN

Se ha iniciado el mejoramiento genético de la tuna en el banco nacional de germoplasma de tuna, ubicado en Vizcachayoc (2 750 msnm.), Huamanga, en Ayacucho-Perú, con la finalidad de incrementar la producción por planta y mejorar la calidad de la fruta, así como obtener ecotipos tolerantes a plagas y enfermedades, al calor, frío, helada, granizada, viento, al exceso de humedad y a otros factores negativos que se vienen presentando últimamente con el fenómeno del cambio climático. Se determinó el momento óptimo de la fase pre hembra para la polinización manual de la tuna que es a los 42 días después de la emergencia de la yema floral. La fase pre hembra dura solo un día, momento en que debe procederse a la polinización manual en horas de la mañana porque pasado el medio día la flor se abre completamente con el calor. Una vez polinizada la flor el fruto cuaja en 08 días y demora 130 días en llegar a la madurez fisiológica.

Palabras claves: polinización, ecotipos promisorios, cambio climático.

ABSTRACT

It has been initiated with the genetic improvement of tuna in the germplasm bank of tuna, located in Vizcachayoc (2 750 msnm.), Huamanga, Ayacucho Peru, with the purpose of increasing the production per plant and improve the quality of the fruit, as well as obtain ecotypes tolerant to pests and diseases, heat, cold, frost, hailstorm, wind, an excess of humidity and other negative factors that has been presenting lately with the phenomenon of climate. It was determined the optimal timing of the pre female to hand pollination of tuna, which is at 42 days after the emergence of the flower bud. The pre female lasts for only a day, the moment when they should be hand-pollination in the early hours of the morning by that past the middle of the day the flower opens completely with the heat once pollinated flower the fruit curdles in 08 days and delay 130 days to reach physiological maturity.

Key words: Pollination, ecotypes promising climate change

INTRODUCCION

El crecimiento de la población y la demanda de alimentos nos exigen producir alimentos en mayor cantidad por unidad de superficie, por lo tanto es necesario iniciar con el mejoramiento genético de la tuna para incrementar la producción por planta y mejorar la calidad de la fruta, así como obtener biotipos tolerantes a plagas y enfermedades, al calor, frío, helada, granizada, viento, al exceso de humedad y a otros factores negativos que se viene presentando últimamente con el fenómeno del cambio climático. Ante esta situación actualmente en los ecotipos promisorios del banco nacional de germoplasma de tuna, ubicado en Vizcachayoc (2 750 msnm.), Huamanga, en Ayacucho-Perú, se viene realizando la polinización manual con la finalidad de mejorar la calidad de fruta y obtener biotipos resistentes o tolerantes a la "Cercosporiosis" que tanto daño viene causando en los valles interandinos por debajo de los 2 600 msnm.

MATERIALES Y MÉTODOS

Antes de proceder con la polinización manual de la tuna, se estudió las fases del desarrollo floral desde la formación de yemas florales hasta el cuajado del fruto con la finalidad de determinar el momento de la flor en estado pre hembra (cuando los pétalos están totalmente cerrados) que dura un solo día. La polinización manual consistió primero en realizar la emasculación de los estambres para convertirlo en flor hembra para luego mediante un pincel extraer polen de una flor abierta considerada como flor macho y proceder a la polinización manual en horas de la mañana. Una vez polinizada la flor se cubrió con una capucha de papel para proteger de la entrada del polen de otros biotipos por parte de los agentes polinizadores como son los insectos y el viento.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los cruzamientos se realizaron considerando los ecotipos promisorios tanto machos como hembras en cada cruce. El ecotipo PTI-013 que es la blanca gigante o la "Cayhua" de buen tamaño de fruto, con poco dulce, se cruzó con PTI-003, blanca pequeña, de sabor dulce, para obtener un híbrido de buen tamaño y de sabor dulce. Igualmente se cruzaron los ecotipos morados con los amarillos y estos con los blancos para mejorar el sabor de la fruta, por que las tunas con cáscaras amarillas tienen mayor dulce que las moradas y estas mayor dulce que las blancas. Actualmente estos cruces se encuentran en semillas F1 que serán propagadas en condiciones de invernadero.

Cuadro 1. Cruzamiento de los ecotipos promisorios de tuna del banco nacional de germoplasma

Ecotipos	Cruzamientos		Fecha de Polinización	Hora de Polinización
	Macho	Hembra		
Morada x Blanca	PTI-047	x PTI-045	11/10/2010	11.35 am.
Blanca x Morada	PTI-045	x PTI-047	11/10/2010	12.00 pm.
Blanca x Blanca Gigante	PTI-003	x PTI-013	11/10/2010	12.45 pm.
Blanca Gigante x Blanca	PTI-013	x PTI-003	13/10/2010	12.40 pm.
Amarilla x Blanca	PTI-011	x PTI-003	25/10/2010	11.35 am
Blanca x Amarilla	PTI-003	x PTI-011	25/10/2010	10.30 am
Morada x Amarilla	PTI-047	x PTI-011	26/10/2010	10.40 am.
Amarilla x Morada	PTI-011	x PTI-047	26/10/2010	10.15 am.



Figura 1. Emasculación de los estambres de la flor de tuna



Figura 2. Polinización manual de la tuna.

De acuerdo a los resultados encontrados se concluye lo siguiente:

1. Se determinó a la fase pre hembra como momento óptimo para la polinización manual de la tuna, situación que ocurre a los 42 días después de la emergencia de la yema floral.
2. La fase pre hembra solo dura un día, momento en que debe procederse a la polinización manual en horas de la mañana, porque pasado el medio día, la flor se abre completamente con el calor con el riesgo de que el estigma pueda contaminarse de polen debido a los polinizados naturales.
3. Una vez polinizada la flor el fruto cuaja en 08 días y demora 130 días para llegar a la madurez fisiológica.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Barbera, G., Inglese, P. & Pimienta, E. 1999. Agroecológica, cultivo y usos del nopal. FAO. Roma-Italia. Pag. 222.

<http://www.inia.gob.pe/eventos/evento0206/>.

<http://www.upbusiness.net/Upbusiness/docs/mercados/12.pdf>

Mantenimiento de pureza varietal de algodón (*Gossypium barbadense*) var. Tangüisen la producción de semilla certificada.

Teodorico VERAMENDI HIDALGO; Diego MEDINA GUERRERO, Diana DÍAZ SIMEÓN, Melanie UBILLÚS TRINIDAD, Bryan GRANADOS CALDERÓN, Lucero JULCA CARHUATANTA, Yesica SERPA PALOMINO, Joselyn RAMOS TORRES, Claudia ARRASCUE VARGAS, Luis INGAR DE LA CRUZ, Gabriela YACHACHIN TUNQUE, Raúl H. BLAS SEVILLANO

cif.unalm@gmail.com, tveramendi@hotmail.com, rblas@lamolina.edu.pe

¹Programa de Algodón, Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM); ²Círculo de Investigación en Fitomejoramiento, UNALM

RESUMEN

Con la finalidad de mantener la pureza varietal y producción de Semilla Certificada en Algodón var. Tangüis-UNA1, se realizó la selección de los mejores 1000 plantas de algodón para realizar autopolinizaciones en la producción de la semilla básica. Estas semillas mantienen la identidad genética y garantizan altos rendimientos con buena calidad de fibra en la producción comercial.

ABSTRACT.

In order to preserve varietal purity and certified seed production of cotton var. Tangüis-UNA1, we selected the best 1000 cotton plants to perform self-pollinations on basic seed production. These seeds maintain the genetic identity and guarantee higher yield with good fiber quality in the commercial production.

INTRODUCCIÓN

El cultivo de algodón en el Perú se siembra en la costa y selva peruana, siendo la var. Pima y la var. Tangüis las que ocupan la mayor extensión de siembra debido a la mejor calidad de fibra que poseen. La variedad Tangüis ocupa el 80 % de las áreas de siembra y es la variedad que se adapta a las condiciones climáticas de costa central y sur de nuestro país (MINAGRI, 2014). Durante los últimos años las áreas de siembra han ido reduciéndose cada vez más en nuestro país y como el objetivo de la siembra de algodón es la utilización de la fibra es necesario mantener la calidad de fibra para la producción de tejidos de la mejor calidad, destinadas a los mercados internacionales más exigentes. Razón por la cual es necesario realizar un trabajo de mejoramiento genético constante a fin de mantener la pureza de la semilla y producir una semilla certificada de calidad. El proceso de producción de semilla incluye el mantenimiento de semilla genética, obtención de semilla básica, semilla registrada y semilla certificada.

Como Círculo de Investigación en Fitomejoramiento (CIF) tenemos la finalidad de apoyar en la obtención de una semilla de alta calidad física, fisiológica, sanitaria y genética, para mejorar la producción y productividad del cultivo de algodón Tangüis en el país.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material Genético.

El presente trabajo se realizó en la especie *Gossypium barbadense* variedad Tangüis, UNA No. 1, en el Campo experimental del Programa de Algodón de la UNALM, en 2.5 has de producción comercial.

Metodología

Para realizar la labor de mantenimiento de pureza varietal se trabajó en 4 zonas en donde se tienen los mejores linajes, se realizó la selección de plantas, mediante la colocación de una cinta roja a las plantas que contaban con las siguientes características:

- Presencia de ramas con doble simpodio.
- Entrenudos cortos, el índice de inserción del primer simpodio (IIRF) entre 6 a 8.
- La planta no debe estar despuntada.
- La planta debe tener una altura menor a 1.65 m. y buena fructificación.

A continuación, se visualizaron botones florales de una coloración verde-amarillenta, y se les colocó un conito de papel (Figura 1), cuya función es asegurar la autofecundación y evitar la libre polinización por presencia de agentes polinizadores como abejas, abejorros y el viento (Penna, 1982).

Figura 1. Selección de plantas tipo y proceso de autopolinización



Foto 01
Fecha: 13/03/14
Planta seleccionada y
autofecundada

Foto 02
Fecha: 08/05/14
Flor emasculada por el método
de Vega Bancalari

Foto 03
Fecha: 08/05/14
Flor emasculada por el método
convencional

Foto 04
Fecha: 08/05/14
Progenitor polinizado y protegido
con un sobre y etiquetado

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se obtuvieron alto porcentaje de prendimiento, las semillas obtenidas de esta forma se destinan una parte para la siembran y otra parte es guardada como reserva. De una ½ ha de semilla básica, se obtiene semilla para sembrar 40 ha de semilla registrada y finalmente 5800 ha de semilla certificada. Estas semillas, garantizan la conservación de la calidad genética de la variedad UNA-1, manteniendo las características de nuestra variedad con las características deseadas para la producción de semilla certificada.

CONCLUSIÓN

Es una práctica fácil y eficiente que se debe implementar en la producción de semilla, para evitar degeneración de las variedades del algodón.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- MINAG. 2014. Algodón-Generalidades del producto[en línea]<[http://www.minag.gob. />](http://www.minag.gob.pe/portal/sector-agrario/agricola/cultivos-de-importancia-nacional/algod%C3%B3n/generalidades-del-producto13?start=1)[Consulta: 20/05/14].
- UNALM. Algodón. [en línea]<<http://www.lamolina.edu.pe/Investigacion/programa/algodon/>>[Consulta: 18 /05/14].
- PENNA J. 1982 . Mejoramiento del algodnero. Informe Agropecuario. Pg. 10-12 EPAMIG – Brasil.
- BASURTO, A. 1993. Manual técnico el cultivo del algodnero “Tangüis” en el Perú. 101p

Estudio de la variabilidad genética de *Phaseolus sp.* I. mediante análisis morfométricos y bioquímicos en la provincia de La Convención – Cuzco

¹ Valderrama Valencia, María R., ² Villalta Bolomer, Gustavo G., ³ Lizárraga Céspedes, Carol L.

¹ Departamento de Genética de la Escuela profesional de Biología de la Universidad Nacional de San Agustín

^{2,3} Laboratorio de Genética, Escuela Profesional y Académica de Biología, Universidad Nacional de San Agustín

¹ marov52@yahoo.com, ² gustavovillab@gmail.com, ³ clizarragac@gmail.com.

RESUMEN

Con la finalidad de conocer la variabilidad genética de *Phaseolus sp.* de la provincia de la Convención del Cuzco se analizaron 11 ecotipos de semillas de *Phaseolus sp.* (Jaspeado, San Jacinto, Capsula, Sangre de toro, Bayo, Limeñito, Comandante, Canario, Pitipoa, Brasilerito y el Silvestre) de los que tomaron datos de la longitud de la semilla (LS), Ancho Lateral (AL), Ancho Anteroposterior (AA), Longitud del Hilum (LH), Ancho del Hilum (AH), Longitud del Micrópilo (LM), Longitud del Rafe (LR), y se les aplicó análisis de componentes principales (CP) y análisis canónico variado (CVA) que nos describió 4 grupos (G), G conformado por frijol silvestre, el G2 agrupa a Pitipoa, el G3 conformado por Brasilerito, y el G4 agrupa a Limeñito, Comandante, Canario, Bayo, Jaspeado, San Jacinto, Capsula y Sangre de toro; siendo la longitud de la semilla (LS) y Ancho Lateral (AL) los que describen la mayor variabilidad. En cuanto al análisis de la variabilidad Bioquímica usando a la (faseolina) describe 6 grupos (F): F1 conformado por el Silvestre, F2 que lo conforma Brasilerito y Comandante, F3 contiene a Pitipoa, el F4 agrupa a Bayo y Limeñito, el F5 lo compone Jaspeado, San Jacinto y Capsula, y el F7 agrupo a Canario y Sangre de Toro. Lo que nos indica que existe materia prima para elaborar programas de mejora en cuanto a tamaño de la semilla y contenido de Faseolina.

Palabra Clave: Ecotipos, Análisis morfométrico, Análisis bioquímico, Electroforesis SDS PAGE, Faseolina.

ABSTRAC

In order to assess the genetic variability of *Phaseolus sp.* province of Cuzco Convention 11 seed ecotypes were analyzed *Phaseolus sp.* (Heather, San Jacinto, Cápsula, Bull's Blood, Bayo, Limeñito, Commander, Canario, Pitipoa, Brasilerito and Silvestre) of you who took the data length of the seed (LS) Lateral Width (AL) Anteroposterior width (AA), hilum length (LH), hilum width (AH), micropyle length (LM), Rafe length (LR), and we applied principal component analysis (PC) and canonical analysis varied (CVA) that we 4 groups (G), G formed by wild bean, G2 Pitipoa groups, made up Brasilerito G3, and G4 groups Limeñito, Commander, Canario, Bay, Heather, San Jacinto, and Blood Capsule bull; being the seed length (LS) and the wide side (AL) describing the increased variability. For analysis of Biochemistry variability using the (phaseolin) describes 6 groups (F) formed by Silvestre F1, F2 and it conforms Brasilerito Commander contains Pitipoa F3, F4 and Limeñito Bayo groups, the F5 Heather composes, San Jacinto and capsule, and grouped to F7 Canario and Sangre de Toro. Which indicates that there is raw material for breeding programs in terms of seed size and content Phaseolin.

Keyword: Ecotypes, Morphometric analysis, Biochemical analysis, Electrophoresis SDS PAGE, Phaseolin.

INTRODUCCION

El frijol común *Phaseolus sp.* L. importante en países en desarrollo de América y en África, regiones donde se produce el 47% y 24% respectivamente de la producción mundial de frijol seco (Becerra & Gepts, 1994). Cultivada principalmente en la provincia de la Convección – Cusco donde ha adquirido una gran importancia debido a su gran variabilidad, trayendo beneficios económicos a los agricultores de dicha zona. Existe escasos estudios de caracterización morfométrica, bioquímica y molecular que determinen la variabilidad genética de *Phaseolus sp.* L. (frijol común).

Este proyecto tiene como objetivo principal dar a conocer la variabilidad de *Phaseolus sp.* usando descriptores morfométricos y bioquímicos (proteínas de reserva como faseolinas) es de suma importancia contar con la información acerca de la variabilidad genética de los materiales básicos para iniciar un programa de mejoramiento del frijol (Ramírez, 1982; Silbernagel et al., 1991) que tenga como prioridad

augmentar el grado de tolerancia a los factores bióticos y abióticos, además de mejorar el valor nutricional de este. Los recursos genéticos de una especie vegetal constituyen la materia prima con la que los fitomejoradores producen nuevas variedades (FAO, 1996)

A pesar de la gran importancia del cultivo, la caracterización de proteínas entre genotipos no ha sido cubierta, salvo lo referente a proteínas particulares como el caso de las faseolinas o argelinas (Montoya et al., 2008). Por lo que se pretende enriquecer el conocimiento de la variabilidad de *Phaseolus sp.* de la convención del Cuzco

MATERIAL Y METODOS

Obtención de semillas de *Phaseolus sp.* L. "Frijol común"

Se colectaron 11 tipos de semillas de *Phaseolus sp.*, procedentes del distrito de Quellouno, provincia de la Convención, departamento de Cusco.

Análisis morfométrico de variedades de *Phaseolus sp.*: Se tomaron medidas de las semillas en base a los siguientes caracteres: Longitud de la semilla (LS), Ancho Lateral (grosor) (AL), Ancho Anteroposterior (AA), Longitud del Hilum (LH), Ancho del Hilum (AH), Longitud del Micrópilo (LM), Longitud del Rafe (LR), y se hicieron análisis de componentes principales y Análisis Canonico (CVA), utilizando el software PAST,

Análisis de las proteína de reserva (Faseolina) en variedades de *Phaseolus sp.* Se usó 30 mg de harina a la que se le añadió CINA 0.4 M que contuvo 2- mercaptoetanol al 3% y agitó 60 r.p.m por 1 h se dejó reposar 18 h a temperatura ambiente; y centrifugó a 13000 r.p.m. en frío por 1 hora al sobrenadante se le añadió 300 uL de tampón reductor (Tampón tris HCL -0.5 M (pH 6.8) 17.5 mL, SDS 2 g, 2-mercaptoetanol 5 mL y glicerol 10 mL, se agita y se colocaron en baño maría por 5 min, y se detuvo la reacción por inmersión de los tubos en hielo para finalmente realizar la corrida electroforética en SDS-PAGE según el método de (Laemli, 1970),

Análisis de bandas de proteínas de *Phaseolus sp.* Las bandas resultantes fueron analizados en el programa TOTALLAB L-100, Con las bandas se elaboró una matriz básica de datos (MBD) para analizarlos por clasificación jerárquica (cluster analysis) utilizando el programa PAST para finalmente obtener un Fenograma mediante el coeficiente de similaridad de Jaccard.

RESULTADOS Y DISCUSION

Obtención de semillas y caracterización fenotípica de *Phaseolus sp.* "Frijol común" Las características fenotípicas de cada tipo de semillas en base a los descriptores del CIAT (1984).



Fig.1. Muestra los 11 tipos de semillas de *Phaseolus sp.*: Silvestre (1), Jaspeados (2), San Jacinto (3), Capsula (4), Sangre de toro (5), Bayo

(6), Canario (7), Limeño (8), Comandante (9), Pitipoa (10), Brasilerito (11).

Las semillas *Phaseolus sp.*, colectadas varían en tamaños y diversas formas entre estos, ya que son el resultado según Beebe, 2000; y Rodrigo, 2000, De Ron (2010) de un proceso de domesticación, intercambio de pool genético y evolución que se fue dando a partir de una forma silvestre *P. vulgaris* var. *Aborigineus*.

Análisis morfométrico de *Phaseolus sp* según el Análisis de componentes principales (CP) indica que la Longitud de la semilla (LS) y Ancho Lateral (grosor) (AL) acumula la mayor cantidad de varianza (97.40%),

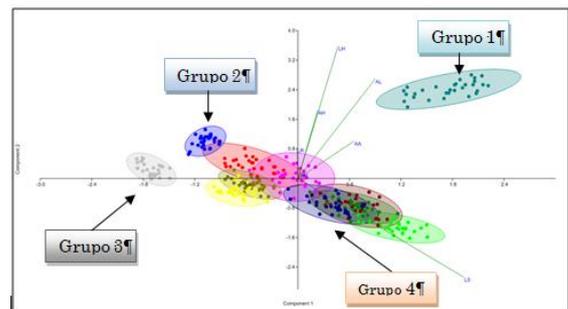


Gráfico 2. Gráfico de los dos primeros componentes principales de ACP y los biplot realizado con los 7 caracteres de medición de 11 tipos de semillas de *Phaseolus sp*, donde: Silvestre (color cobalto), Pitipoa (azul), Brasilerito (plomo), Limeño (amarillo), Comandante (rojo), Canario (lila), Bayo (verde olivo), Jaspeado (azul oscuro), San Jacinto (marrón), Capsula (verde oscuro), Sangre de toro (verde fosforescente)

En el gráfico 2 se observa claramente 4 agrupaciones bien definidas, donde el Grupo 1 lo constituye solo semillas de frejol silvestre, el Grupo 2 compuesta de semillas del Pitipoa, el Grupo 3 agrupa a semillas de Brasilerito, y el Grupo 4 agrupa a 8 semillas: limeño, Comandante, Canario, Bayo, Jaspeado, San Jacinto, Capsula y Sangre de toro. También se muestra el biplot de los caracteres que demuestra la correlación entre estos, en este caso el carácter longitud de la semilla se correlaciona con el ancho lateral de la semilla.

Análisis canónico variado: El análisis de los 7 caracteres morfométricos seleccionados por CP, utilizando el tipo de semilla como variable de discriminación; revelaron que las semillas de Limeño, Comandante, Canario, Bayo, Jaspeado, San Jacinto, Capsula, Sangre de toro, presentan una similitud respecto a sus caracteres morfométricos, y las semillas de Brasilerito y Pitipoa que forman grupos individuales, presentando poca similitud entre sus caracteres y son más variables, y por último las semillas del Silvestre se muestra como un grupo muy alejado respecto a las demás variedades, ya que hay mayor variabilidad en sus caracteres analizados.

Análisis bioquímico de variedades de *Phaseolus sp.*

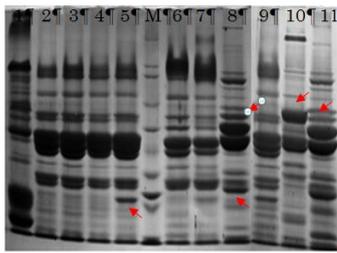
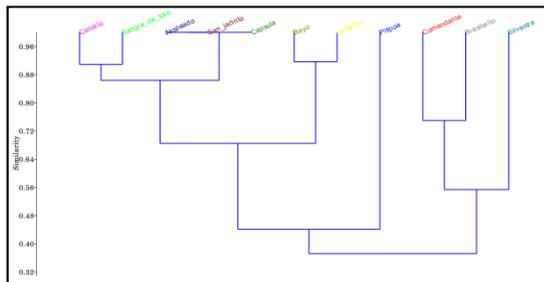


Grafico 4. Gráfico que muestra el bandeo de proteínas mediante la técnica de electroforesis SDS-PAGE, para 11 tipos de semillas de *Phaseolus sp.*, 10 µl en cada carril, donde (M) Marcador, (1) Silvestre, (2) Jaspeado, (3) San Jacinto, (4) Capsula, (5) Sangre de toro, (6) Bayo, (7) Limeñito, (8) Comandante, (9) Canario, (10) Pitipoa (11) Brasilerito.

El análisis bioquímico de la faseolina (gráfico 4) muestra las bandas de proteínas totales extraídas de 11 ecotipos de semilla de *Phaseolus sp.*, en donde se observa que las semillas del silvestre (1), difiere de todas las demás, respecto a la distribución de sus bandas de proteínas, asimismo las semillas de Jaspeado (2), San Jacinto(3) y Capsula(4), se asemejan respecto a sus bandas de proteínas, la variedad Sangre de



toro(5) y Canario(9), también presenta similitud entre sus bandas, la semillas de Bayo(6) y Limeñito(7) presentan bandas similares; así como también la variedad Comandante(8) y Brasilerito(11) presentan afinidad entre sus bandas, y finalmente Pitipoa(10) que presenta bandas distintas a las demás. El cluster (fig formado indican la formación de tres grupos el grupo 1 forma canario, sangre de toro, jaspeado, San Jacinto, capsula, bayo y limeñito, el grupo 2 contiene a Pitipoa, y el grupo 3 contiene a comandante, brasileño y silvestre.

BIBLIOGRAFIA

Becerra, V., and P. Gepts, 1994. RFLP Diversity of common bean (*Phaseolus vulgaris* L) in its centers of origin. *Genome*. 37:256-263.

Beebe, S., Skroch, P., Tohme, J., Duque, M., Pedraza, F. y Nienhuis, J. (2000). Structure of genetic diversity among common bean landraces of Middle American origin based on correspondence analysis of RAPD. *Crop Science*, 40, 264–273.

De Ron, a., a. Gonzales, m. de la Fuente, a. Rodiño, J. Mansilla, M. Saburido, 2010. Catálogo de germoplasma de *Phaseolus* de la misión biológica de Galicia-CSIC. Edit. Misión biológica de Galicia – CSIC. Pontevedra, España. pp 11-143

FAO (ed.) 1996. Conferencia Técnica internacional sobre los recursos filogenéticos, Leipzig, Alemania. 17-23 junio.

Gepts, P., Osborn, T., Rashka, K. y Bliss, F., 1986. Phaseolin protein variability in wild forms and landraces of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.): evidence for multiple centers of domestication. *Econ. Bot.* 40(4), 451-468.

Islam, F.M.A., S. Beebe, M. Muñoz, J. Tohme, R.J. Redden, and K.E. Basford 2004. Using molecular markers to assess the effect of introgression on quantitative attributes of common bean in the Andean gene pool. *Theor Appl Genet.* 108:243- 252.

Laemli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.

Ramírez, D. 1982. Evaluación del potencial genético en habichuela *Phaseolus vulgaris*, L. Tesis Ing. Agr., Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira. *Review. Crop Sci.* 41:1659-1675

Rodrigo, A. (2000). Caracterización morfoagronómica y bioquímica del germoplasma de judía común (*Phaseolus vulgaris* L.) de España. Universidad de Santiago de Compostela. Pontevedra, España.

Silbernagel, M, W Janssen, J Davies, G Montes de Oca. 1991. Snap bean: Production in the Tropics Implications for Genetic Improvement. In *Common beans: Research for Crop Improvement*. Ed. by A. van Schonhoven & O. Voysest. CAB-CIAT, Cali, Colombia.

Singh, S., Nodari, R. y Gepts, P., 1991. Genetic Diversity in Cultivated Common Bean: I. Allozymes. *Crop Sci*, 31, 19-23.

EVALUACION DE CUATRO CICLOS DE SELECCIÓN MAZORCA HILERA MODIFICADO EN LA RAZA DE MAIZ SAN GERONIMO

C. OSCANOA¹ M. UNTIVEROS¹ P. NUÑEZ¹

¹Instituto Nacional de Innovación Agraria INIA, Programa Nacional de Investigación en Maíz. Estación Experimental Agraria Santa Ana, Huancayo Perú.

¹caoscanoarodriguez@hotmail.com

ABSTRACT

Four cycles of modified ear-to-row selection applied to the San Geronimo Race of maize, are compared with the objective to estimate the changes in characters of each cycle. Experiment are installed in Junín region of Peru at 3292 masl of height, 12°00' south latitude, 75°13' west longitude in EEA Santa Ana of INIA Huancayo in 2012-2013 crop season; complete design randomized with six replication, five treatments; installed in four rows of 5.0 m of length; 0.8 m distance between rows, 0.2 m distance between hills, one plant per hill, 8.32 m² plot size with 52 plants per plot, equivalent to 62,500 plants per hectare, fertilization N (120 kg ha⁻¹), P₂O₅ (80 kg ha⁻¹), K (60kg ha⁻¹). Characteristics observed are: Grain yield, weight of 1000 grains, days till male and female flowering, blister, milk, dough stage; physiological maturity. Leaf disease resistance and plant aspect. Compared the cycles the analyses suggest that the average of yield of each cycle are statistically different. Cycle four is different to cycle two and three; but both are no deferent; those are different to cycle one and zero; the last one is different to cycle one. Cycle zero was estimated in 767 kgha⁻¹ of grain yield; cycle one 1,609 kgha⁻¹, 3,077 and 2,745 kg ha⁻¹ cycle two and three; finally four cycle 4,175 kgha⁻¹. By another hand, the population makes earlier, improve plant aspect and leaf sanity especially at leaf disease

KEY WORDS: Maize race; Cycle; Diversity.

INTRODUCCION

El conocimiento y aprovechamiento de la diversidad de los cultivos facilita la conservación, caracterización y utilización sostenible. Antes de iniciar el mejoramiento y la formación de ciclos de selección del maíz amiláceo de la sierra central del país se colectó toda la diversidad del cultivo, se clasificó, recombinó y formaron los ciclos de selección con el objetivo de lograr compuestos raciales para centralizar la recombinación, selección, preservación de la diversidad y uso; esencial para el desarrollo de una agricultura sostenible y asegurar la conservación y seguridad alimentaria.

MATERIALES Y METODOS

Los materiales evaluados son cuatro ciclos de selección familiar de medios hermanos mazorca por surco modificado de la raza San Gerónimo. Se instala en la región Junín a una altitud de 3292 metros, 12°00' latitud sur; 75°13' longitud oeste en campos de la EEA Santa Ana durante la campaña agrícola 2012-2013, en diseño de bloque completo randomizado con seis repeticiones y cinco tratamientos; los cuales son: Ciclo cero (C0), ciclo uno (C1), ciclo dos (C2), ciclo tres (C3) y ciclo cuatro (C4). Cada tratamiento se siembra en cuatro surcos de 5.0 m largo por 0.8 m entre surco con un grano por golpe a 0.2 m de distancia; a una densidad de 62,500 plantas por hectárea con nivel de fertilización de 120-80-60 NPK. Las características registradas son: Rendimiento de grano, peso de mil granos, días a floración masculina y femenina, días a estado de ampolla, grano lechoso, pastoso y madurez fisiológica; aspecto de planta y enfermedades de hoja. Los datos se registran según fenología del cultivo. Floración femenina (Vt), floración masculina (R1), grano ampolla (R2), grano lecho (R3), grano pastoso (R4), madurez fisiológica (R6). La resistencia a enfermedades de hoja se registra en: Muy alto (1), alto (2), regular (3), baja (4), muy baja (5). Para el caso del análisis de varianza en la fuente de variación se considera bloque, tratamiento, error y total, con grados libertad 5, 4, 20 y 29 respectivamente. La prueba de significación considera la diferencia significativa honesta de Tukey al 95%.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Comparado los ciclos de selección de la raza San Gerónimo el análisis de varianza sugiere lo siguiente (Tabla 1): En la fuente de variación de bloque se observa diferencias no significativas entre bloque; para tratamiento hay diferencias estadísticas altamente significativas. El coeficiente de variabilidad estimado es 16.90%.

Tabla 1. Análisis de varianza de rendimiento de grano (kg/ha)

Fuente de variacion	gl	SC	CM	FC	Ft	Sig	
					0,05	0,01	
Bloque	5	1297486,2	259497,2	1,5	2,71	4,10	ns
Tratamiento	4	41950368,6	10487592,1	60,0	2,87	4,44	**
Error	20	3498319,6	174916,0				
Total	29	46746174,3					
Promedio=	2474,59	s=	418,23	%CV=	16,90		

En el ciclo cero el rendimiento de grano se estima en 767 kg/ha; en el primer ciclo 1,609 kg ha⁻¹, en segundo 3,077 kg ha⁻¹, en tercer ciclo 2, 745 kg ha⁻¹ y en el cuarto ciclo 4175 kg ha⁻¹ (Tabla 2). El promedio del C4 es diferente a los demás ciclos; los promedios del segundo y tercer son iguales estadísticamente; hay diferencias estadísticas entre los promedios del ciclo uno y cero (Figura 1). La diferencia significativa honesta de Tukey al 95% para esta característica sugiere 722 kg ha⁻¹ de grano.



Figura 1. Rendimiento de grano de los ciclos de selección de la raza San Gerónimo



Figura 2. Resistencia a enfermedades de hoja grado 4 (izquierda); grado 2 (derecha)

Analizado la variación durante los ciclos de selección para peso de mil granos indica que hay diferencias estadística no significativa. El promedio del peso de mil granos de los cinco tratamientos es 491g, el valor máximo observado es 510g y mínimo 475g habiendo similitud estadística. Los días a floración masculina, femenina y grano ampolla se observa diferencias estadísticas significativas. El valor máximo para días a floración masculina es 95.7 y mínimo 91; lo mismo para días a floración femenina el valor máximo es 100 y mínimo 96; y para grano ampolla 107 y mínimo 105; estos dato sugieren que durante los ciclos de selección la población se hace mas precoz. No se observa diferencias estadísticas para grano lechoso pastoso y madurez fisiológica. El aspecto de planta ha mejorado de regular a bueno; lo mismo para enfermedades foliares mejora de resistencia mala a enfermedades de hoja (grado 4) a resistencia buena (grado 2) ver Figura 2.

Tabla 2. Características de cinco ciclos de selección de la raza San Gerónimo

Genealogia	Grano		Flor		Estado Reproductivo				Aspecto planta	Enfermedades de hoja	
	Rendimiento	Peso de 1000 granos	Macho	Hembra	Ampolla	Lechoso	Pastoso	Madurez fisiológica		R4	R3
	R7	R7	R1	Vt	R2	R3	R4	R6		(1-5)	(1-5)
	kg/ha	Gramos	Dias	Dias	Dias	Dias	Dias	Dias			
Ciclo cero	767 d	475,3	95,7	100,2	107,0	116,2	172,4	192,0	4	3	
Ciclo uno	1609 c	477,2	92,8	98,7	107,0	116,0	169,0	187,2	4	3	
Ciclo dos	3077 b	509,7	92,7	97,7	106,0	115,5	168,2	189,5	3	2	
Ciclo tres	2745 b	502,3	91,8	96,8	105,7	115,3	168,3	189,7	3	2	
Ciclo cuatro	4175 a	490	91,0	96,0	105,0	115,2	167,0	187,3	2	3	
Promedio	2475	491	92,8	98	106,1	115,6	169,0	189,1	3	2	
Maximo	4175	510	95,7	100	107,0	116,2	172,4	192,0	4	3	
Minimo	767	475	91,0	96	105,0	115,2	167,0	187,2	2	2	
%CV	16,9	9,37	2,47	2,3	1,17	0,86	18,7	1,7			
DSH(T) 0.05	722,2	79,49	3,96	3,89	2,15	1,68	54,5	5,4			
Significacion	**	ns	*	*	*	ns	ns	ns			

Panojamiento [(Vt), emergencia del estigma (R1), grano ampolla(R2), grano lechoso (R3), grano pastoso (R4), madurez fisiologica (R7), grano con 14% de humedad (R7)

Muy bueno o muy resistente a enfermedades (1), muy malo o muy susceptible a enfermedades (5)

BIBLIOGRAFIA

- BANZINGER, M; 1999. Field book y alfa programa para crear y analizar diseños. CIMMYT, Mexico.
- COORS, J. G; PANDEY, S; 1999. The genetics and exploitation of heterosis in crops. Madison Wisconsin USA. 99-118p
- MÁRQUEZ S., E 1985. Genotecnia Vegetal. Tomo I. Métodos, teoría y resultados. AGT Editor, S.A. México, D. E 247-248p.
- LITTLE, T. M; HILLS, F. J; 1991. Métodos estadísticos para la investigación en agricultura. Editorial Trillas, S.A. México 59-65p
- OSCANOA,C; SEVILLA, R; 2010. Razas de maíz de la sierra central del Perú. INIA. EEA Santa Ana. Perú.
- PALIWAL, R., GRANADOS G. y LAFITTE R. 2001. El Maíz en los Trópicos: Mejoramiento y Producción. CIMMYT. El Batán México.

“ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA DE *Carica papaya*, Y BUSQUEDA DE RESISTENCIA A LA MANCHA ANULAR (PRSV)”.

Mack Pinchi¹, Cesar Valera¹ y Raúl Blas²

¹Universidad Nacional de Ucayali, ²Universidad Nacional Agraria La Molina

I. INTRODUCCION

El cultivo del papayo es uno de los más importantes en la amazonía peruana debido a que ha cobrado importancia económica en los últimos 10 años, constituyéndose en el principal productor y abastecedor del mercado de Lima e involucrando a más del 35% de los agricultores en las distintas etapas de la cadena productiva. La calidad de la fruta, el desarrollo vegetativo corto y la cosecha semanal, luego de haber iniciado la producción, permite el rápido retorno del capital invertido.

Actualmente los productores de papaya en Ucayali se encuentran concentrados en las zonas de Curimaná, Iparía en donde las plantaciones se encuentran altamente infectadas por el virus de la mancha anular del papayo. En Masisea el cultivo fue destruido completamente por la virosis, las plantaciones que aún quedan, se encuentran en zona alejadas, por lo que la colecta del material genético de plantas tolerantes a la virosis en estas zonas nos proporcionará una línea de base para las observaciones del período vegetativo y seleccionar aquellas según su comportamiento y tolerancia a plagas y enfermedades puedan proporcionar germoplasma de nuevas variedades mejoradas que satisfagan las necesidades de semilla del productor Ucayalino (MINAG,2011).

En programas de mejoramiento desarrollados en Florida y Taiwan, se ha seleccionado el cultivar dioico Cauliflora, con tolerancia poligéncia cuantitativamente hereditaria. Este material y los obtenidos de él son susceptibles a PRSV-P, pero los síntomas en hojas y frutos son suaves y los árboles producen razonablemente en cantidades y calidad.

En Colombia, el programa de frutales del ICA (Hoy CORPOICA), en Palmira, seleccionó cuatro materiales para ser lanzados como variedades; una de las características de estos genotipos era la tolerancia a PRSV; sin embargo, al evaluarse en campo en otras zonas, resultaron susceptibles al virus. La especie *Carica cauliflora*, que se ha encontrado silvestre desde hace muchos años en el valle del Cauca, es inmune al virus. La pre inmunización, como medida de control de PRSV, ha sido investigada en varios países, entre Taiwan, estados Unidos (Hawai) y Brasil, con limitaciones en su aplicación por la dificultad de asilar cepas o aislados suaves del virus (Páez, 2003)

El mejoramiento genético representa la vía más duradera para controlar las enfermedades virales en el papayo. En varios países se han producido variedades tolerantes mediante cruces entre papayos (Lima et al., 2002)

I. OBJETIVOS

2.1 Objetivos Generales

Evaluar el comportamiento del material genético por procedencia y progenie del cultivo del papayo frente al ataque de la virosis *Papaya ringspot virus* (PRSV) de las zonas infectadas

2.2 Objetivos específicos

- Seccionar individualmente plantas sanas de la población infectada para reproducir el material colectado en parcelas con presencia de virus

- Colectar semillas de plantas de papayo tolerante o resistentes a la mancha anillada por procedencia y progenie de zonas infectadas y estudiar su comportamiento.
- Evaluar plantas en el período vegetativo en base a una ficha de registro de la observación teniendo como criterios: aspectos relacionados a calidad y producción de frutos, respuesta a plagas y enfermedades.
- Detectar y caracterizar plantas promisorias, para el inicio al pre-mejoramiento genético.

III. METODOLOGIA

3.1 Diseño de técnicas de recolección de información

La investigación es de tipo experimental, cuya ejecución tendrá tres etapas, con una duración de tres años:

- Recolección del material genético se hará en todas las zonas productoras y zonas infectadas en los departamentos de Piura, Lambayeque, Amazonas, San Martín, Cajamarca, Arequipa, Cuzco, Huánuco y Ucayali.
- Instalación del material genético recolectado en los campos de la Universidad Nacional de Ucayali, que son áreas infectadas
- Estudio comparativo del material seleccionado por su tolerancia o resistencia al virus PRSV

3.2 Población y muestra

Para la primera etapa la población en estudio de acuerdo a las zonas identificadas para la recolección será de aproximadamente 100 muestras. Para la segunda y tercera etapa la muestra se determinará de acuerdo a la selección realizada y otros criterios de premejoramiento.

IV. RESULTADOS PRELIMINARES

- 4.1 Se concluyó la fase de recolección de germoplasma en los departamentos de Piura(12), Cajamarca(8), Amazonas(5), San Martín(15), Loreto (Yurimaguas 4), Ucayali(20), Huánuco(12), Junín(5), Arequipa(10), Cuzco(15) y Madre de Dios(12), con un total de 118 accesiones (Figura 1).
- 4.2 Se realizó la instalación en vivero con 50 bolsitas almacigueras por muestra y tres semillas por bolsa (figura 2).



A



b

Figura 1. Colección de papaya. a) Visita a jardines, b) Una accesión de papaya, luego de obtención de semillas,



A



b



C



d

Figura 2. Proceso de establecimiento de germoplasma de papaya. a) Almacigos, b) Germinación, c) Plántulas, d) Campo definitivo para plantación.

4.3. Se ha observado alta variabilidad morfológica durante la exploración, entre otras en forma, tamaño y color de la papaya.



A



b

Figura 3. Variabilidad morfológica. a) Diferentes formas de fruto, b) Tamaño de planta y forma de fruto

Conclusiones

Existe una buena variabilidad morfológica y con posibilidad de plantas resistentes a la virosis. Este material servirá para los trabajos posteriores de caracterización morfológica, molecular, y fitopatológica.

CARACTERIZACION MORFOLOGICA DE LOS ECOTIPOS DE MACA

Fisher Huaraca M¹. Raúl Blas Sevillano² Leoncio Cusiche P.³ Jimmy Echevarria V⁴. Susan Atanacio A* y Pilar Condor H*

Facultad de Ingeniería y Ciencias Humanas¹ Universidad Nacional del Centro del Perú, Universidad Agraria la Molina *Estudiante de la Facultad de Ingeniería y Ciencias Humanas

RESUMEN

El presente trabajo de investigación se realizó en la con el objetivo de conocer la biodiversidad del germoplasma de Maca (*Lepidium* spp.). Se colectaron 220 accesiones de Maca en la Provincia de Junín, respectivamente en la Meseta de Bombón, para ello se utilizaron con 17 caracteres morfológicos para su primer evaluación, Se han definido 12 ecotipos según el color de la piel y pulpa de los hipocotilos. También se ha registrado, alta variabilidad en forma, tamaño y diámetro de los hipocotilos. Su nivel de poliploidie son octaploides ($2n=8x=64$) todos las macas cultivadas. La caracterización morfológica de *Lepidium* para está fenotípicamente relacionada en función a los colores y formas de cada uno de ellos aparentemente la variabilidad no es muy alta.

INTRODUCCIÓN

El género *Lepidium* de la familia Brassicaceae está constituido por aproximadamente 175 especies distribuidas en distintas partes del mundo (Mummerhoff *et al.*, 1995; Quirós *et al.*, 1996), pero sólo en el Perú existe la única especie cultivada conocida como “Maca” (*Lepidium meyenii* Walp. o *Lepidium peruvianum*) que se cultiva por sus raíces-hipocótilos suculentos, carnosos y dulces, en las zonas más frías y altas de la región central andina (León, 1964) y posee propiedades nutraceuticas y anticancerígenas como el benzyl glucosinolato y alilglucosinolato (Quirós *et al.*, 2001).

Según Brako y Zarucchi (1993), en el Perú existen 15 especies de *Lepidium* silvestres, pero es poco o casi nada lo que se ha estudiado en cuanto a sus propiedades medicinales, nutraceuticas. El cultivo de Maca en la Meseta del Bombón es exclusivamente orgánico, prescindiendo del uso de agroquímicos. En los últimos años se ha observado una baja significativa del rendimiento de raíces-hipocótilos frescos o secos, debido a la presencia de enfermedades, plagas de campo y almacén, factores climáticos adversos (sequía, heladas muy intensas), ciclo tardío prolongado y uso de antiguas variedades nativas (Ponce, 2010). Así mismo, existe la exigencia y demanda de parte de las empresas importadoras, de contar con un producto de alto contenido de glucosinolatos y otros metabolitos primarios y secundarios (Johns, 1981; Clement, 2010). Por eso, es conveniente la obtención de una variedad genéticamente mejorada para solucionar este problema. Obviamente, se necesita explorar y conocer el germoplasma existente con miras a la incorporación de genes de especies silvestres a la Maca cultivada, en búsqueda de la solución a los problemas del cultivo. Los objetivos fueron: coleccionar, evaluar, clasificar, agrupar y analizar el germoplasma silvestre y cultivado de Maca para su mejoramiento genético.

MATERIAL Y MÉTODOS

Materiales Genéticos. Se analizaron 220 accesiones de maca de la provincia de Junín y del departamento de cerro Pasco. Teniendo en consideración a la Meseta de Bombón.

Caracterización Morfológica. Caracterización morfológica: Se usaron 17 descriptores fenotípicos de planta, raíz, semilla y otros órganos de la planta, de características cualitativas o cuantitativas. Los datos morfológicos usando el paquete NTSYS, v2.1. Adicionalmente, para identificar los ecotipos de la maca con marcadores moleculares.

RESULTADOS PRELIMINARES

Se han definido 12 ecotipos según el color de la piel y pulpa de los hipocotilos. También se ha registrado, alta variabilidad en forma, tamaño y diámetro de los hipocotilos. Además se pudieron encontrar una inflorescencia de un color blanco y amarillento de las diferentes tonalidades según la maduración, los tallos también tienen colores muy distintos predominando más los amarillos y rosados donde ellos enmascaran a los demás colores que se van expresando en función al medio ambiente, debemos rescatar que las plántulas que se encuentran en el campo de semilla los tallos son muy gruesos y eso indica que las semillas serán muy buenas en la producción y son más fértiles. El diámetro de las hojas rastreras son de 40 a 60 cm. el cual nos

permite obtener mayor cantidad de semilla, dentro de ello se encuentran las semillas de un color muy uniforme de 70 % y el resto es de un color muy diferente.

CONCLUSIÓN PRELIMINAR

Los ecotipos de maca encontrados en la Meseta de Bombón se agruparon de 12 hipocotilos en función a los colores y formas de cada uno de ellos aparentemente la variabilidad no es muy alta. Con los que se evaluarán con los marcadores moleculares, para ser agrupados a nivel molecular de AFLP.

BIBLIOGRAFÍA

Brako, L; Zurucchi, 1993. Catálogo de las Angiospermas y Gimnospermas del Perú. Missouri. Bot. Garden. Vol. 45.

Monographs in Systematic Botany. Clément, C; Díaz, D; Manrique, I; Avula, B; Khan, IA; Dante, D; Ponce, A; Kunz, C; Mayer, AC; Kreuzer, M. 2010. Secondary Metabolites in Maca as Affected by Hypocotyl Color, Cultivation History, and Site. Agronomy Journal 102(2): 431-439.

León, J. 1964. The “Maca” (*Lepidium meyenii*), a little know food plant of Peru. Econ. Bot. 18(2): 122-127.

MacBride, JF. 1938. *Lepidium meyenii* Walp. In Field Museum of Natural History (ed.). Flora of Peru, Volume XIII:949-950. Chicago.

Mummerhoff, K; Kuhnt, E; Koch, M; Zunk, K. 1995. Systematic Implications of chloroplast DNA variation in *Lepidium* section Cardamon, *Lepiocardamon* and *Lepia* (Brassicaceae). Plant Systematics and Evolution 196: 75-88.

Johns, T. 1981. The Añu and the maca. J. Ethnobiol. 1(2): 208-212. Ponce, ADD. 1999. Variabilidad de familias S1 y Selección combinada por peso de raíz-hipócotilo en una población selecta de Maca (*Lepidium meyenii*) de fase vegetativa En: Raíces y Tubérculos Andinos. Avances de Investigación. T. Fairlie, M. Morales B., M. Holle (Editores). CIP. Consorcio para el Desarrollo Sostenible de la Ecorregión Andina. pp:177-190.

Quirós, CF; Epperson, A; Hu, JJ; Holle, M. 1996. Physiological and cytological characterization of maca, *Lepidium meyenii* Walp. Econ. Bot. 50: 216-223.

CARACTERIZACION MOLECULAR DE 9 ARBOLES “CACAO DE ORO DEL PERU” MEDIANTE MARCADORES – SNP (Single Nucleotide Polymorphism)

García Carrión, Luis¹, García Rodríguez, Patricia² & Zhang, Dapeng³

¹ Docente e Investigador en Recursos Genéticos y Mejoramiento del Cacao, UNAS-Tingo María
E-mail: lugarc01770@gmail.com

² Especialista e Investigadora del INIA, Estación Experimental Agraria Pichanaki
E-mail: cacaopichanaki@inia.gob.pe

³ Genetista del Servicio de Investigación Agrícola (ARS)/USDA, Beltsville, USA.
E-mail: Dapeng.Zhang@ars.usda.gov

RESUMEN.- Con el objeto de genotipar y dilucidar el origen y estructura genética de 9 árboles “Cacaos de Oro del Perú” con marcadores SNP (Single Nucleotide Polymorphism), se realizó el estudio patrocinado por el Programa de Desarrollo Alternativo (USAID PERU/PDA). El ADN fue extraído por el método CTAB en Perú y el genotipaje usando ADN amplificado mediante PCR y soportado por el espectrómetro de masas usando 54 marcadores polimórficos-SNP, fue realizado en el laboratorio del ARS/USDA. Los resultados sometidos al análisis multivariado por el método de coordenadas principales permitieron ubicar los 9 árboles por su proximidad a grupos genéticos conocidos utilizando como referencia 80 genotipos de cacao (71 peruanos silvestres del grupo Amazonas y 9 del grupo Trinitario). Asimismo, se llegó a inferir por su estructura genética, que todos ellos son nativos de nuestra amazonia y que la mayoría (6 árboles) se han originado de poblaciones silvestres de los ríos Santiago y Morona, y el resto (3 árboles), están vinculados con el grupo de cacaos del Urubamba/ Ucayali/Madre de Dios.

Términos claves: Cacao, Caracterización molecular, Marcadores SNP, Origen y estructura genética.

ABSTRACT.- With the of genotyping and to dilutive the origin and genetic structure from 9 trees “Cacaos de Oro del Peru” with SNP markers (Single Nucleotide Polymorphism), a study patronized by Alternative Development Program (USAID PERU/PDA) was carried out. The DNA was extracted by CTAB method in Peru and the genotyping using DNA amplified by PCR and supported by mass spectrometer using 54 polymorphic markers-SNP, was carried out in the ARS/USDA laboratory. The results submitted to multivariate analysis by principal coordinates method lead to locate the 9 trees by their proximity to known genetic groups utilizing as reference 80 cocoa genotypes (71 Peruvian wilds from Amazon group and 9 from Trinitarian group). Likewise, was inferred by genetic structure that all them are native our amazon and the majority (6 trees) were originated from wild populations of Santiago and Morona rivers, and the rest (3 trees), are linked with the cacaos group from Urubamba/Ucayali/Madre de Dios.

Keywords: Cocoa, Molecular characterization, SNP markers, Origin and genetic structure.

INTRODUCCIÓN.

El cacao (*Theobroma cacao* L), es una especie neotropical originaria de los bosques húmedos amazónicos cuyas almendras constituyen el insumo básico para la industria del chocolate y derivados, la industria cosmética y la industria farmacéutica (García, 2000). Las zonas cacaoteras de la amazonía y costa norte del Perú se caracterizan por producir y conservar cultivares nativos y naturalizados de origen genético desconocido que están siendo reemplazadas por cultivares foráneos más productivos pero de inferior calidad, provocando erosión genética y subutilización de estos recursos fitogenéticos tan valiosos para mejorar la productividad, resistencia a enfermedades, calidad organoléptica y tolerancia a estrés climáticos. La caracterización del germoplasma ya sea morfológica, molecular, organoléptico y fitoquímico; así como, el uso de estrategias combinadas de conservación *ex situ* e *in situ* (en fincas) de germoplasma de cacao nativo, naturalizado y parientes silvestres, serán de mucha utilidad para enfrentar con éxito la adaptación al cambio climático. El estudio tuvo como objetivos de genotipar y dilucidar el origen y estructura genética de 9 árboles “Cacaos de Oro del Perú” utilizando marcadores-SNP .

MATERIALES Y MÉTODOS.

Se utilizaron 9 muestras (árboles) de cacaos premiados: 1 de Tumbes, 4 de Piura, 2 de Amazonas y 2 de Ucayali. La colecta y preparación de las hojas se hizo según el protocolo que se usa en el Laboratorio de Cultivos Perennes Sostenibles del ARS/USDA/Beltsville, USA. El ADN fue extraído por el método CTAB (Doyle & Doyle, 1990) en Perú, y el genotipaje usando ADN amplificado mediante PCR y soportado por el espectrómetro de masas, usando 54 marcadores polimórficos-SNP, fue realizado en el ARS/USDA. El genotipeado a través de marcadores-SNPs soportado por espectrometría de masas, fue analizado estadísticamente usando la técnica multivariada de Coordenadas Principales, análisis Bayesiano y análisis Cluster no jerárquico.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

En el diagrama de dispersión (Fig. 1), se visualizan 4 clusters según su proximidad o similitud genética: (I) Trinitario, (II) Ucayali/Urubamba/Madre de Dios, (III) Nanay e Iquitos, y (IV) Morona/Santiago. Tres genotipos de cacao peruano: CP08, CP010 y CP011, se ubican en el primer cuadrante cercano al cluster Ucayali/Urubamba/Madre de Dios, donde se encuentran los clones SCA-6 y SCA-12 y otros genotipos. El genotipo CP010, por estar más próximo al cuarto cuadrante (cluster Trinitario), tendría cierto grado de parentesco o proximidad genética con los genotipos ICS, por lo que se infiere que estarían compartiendo genes comunes por descendencia. Igualmente, el genotipo CP02, por su mayor cercanía al cluster Nanay/Iquitos (genotipos IMC), también compartirían genes similares. Los genotipos: CP02, CP03, CP04, CP05, CP06 y CP09 ubicados en el segundo cuadrante, están más próximos al cluster Morona/Santiago, pudiéndose inferir que su origen sería las poblaciones silvestres localizadas en estas cuencas hidrográficas.

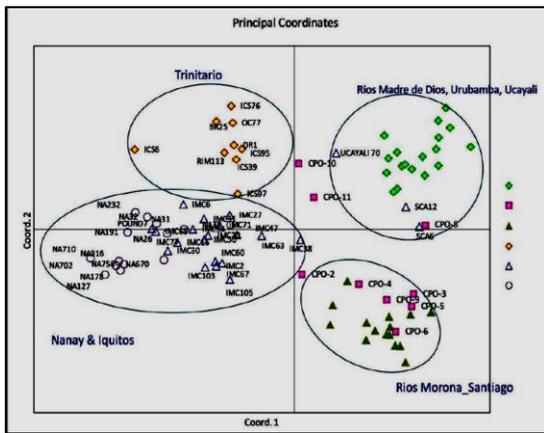


Fig 1. Proximidad genética de 9 genotipos de “cacao oro del Perú” mediante la técnica de coordenadas principales.

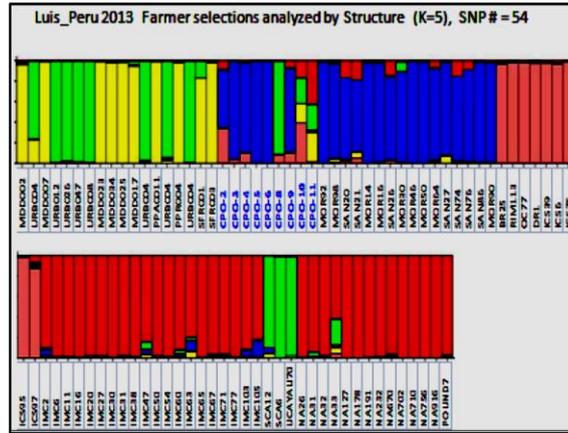


Fig 2. Estructura genética de 9 genotipos de “cacao oro del Perú” y de 80 cacaos (71 peruanos silvestres del grupo Amazonas (F.A.A) y 9 del grupo Trinitario).

Al analizar la identidad genética y procedencia geográfica de los 9 árboles de cacao, basado en su estructura genética (Fig. 2), se infiere que el genotipo CP02 de la región Tumbes, es un híbrido entre Morona/ Santiago x Trinitario; los genotipos CP03, CP04, CP05 y CP06 de la región Piura, son cacaos nativos de la cuenca del río Morona/Santiago; los genotipos CP08 y CP09 de la región Amazonas, son nativos de la cuenca del río Urubamba/Ucayali, y de la cuenca del río Morona/Santiago, respectivamente; mientras que los genotipos CP010 y CP011 de la región Ucayali, son híbridos de Nanay x Ucayali x Trinitario, y de Ucayali x Nanay x Madre de Dios, respectivamente. A pesar de las continuas introducciones de germoplasma exótico al Perú, el germoplasma del grupo genético Amazonas o Forastero del Alto Amazonas (F.A.A), sigue siendo el principal componente del alto nivel de diversidad alélica intraespecífica que existe en los campos del agricultor (Zhang et al, 2011).

Los aborígenes peruanos que domesticaron el cacao de forma incipiente sumada a la actividad antrópica de los colonos de la amazonia, diseminaron y seleccionaron las semillas que se adaptaron a nuevos nichos ecológicos, incluso a regiones muy lejanas de su lugar de origen (García, 2013). Asimismo, se ha favorecido la introgresión (infiltración) de genes exóticos de cultivares Trinitario hacia cultivares Amazónicos (F.A.A) y consecuentemente, la recombinación de genes dentro de este grupo genético. Es necesario seguir apoyando la continuidad de esta iniciativa y otras cuyo propósito sea de rescatar, conservar y utilizar los valiosos recursos genéticos del cacao peruano para ser utilizados en los programas de mejoramiento genético.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

García L.F. 2013. Caracterización Molecular de 11 Árboles de Cacao Mediante Marcadores “Single Nucleotide Polymorphism” (SNP). Informe Final de Consultoría. Iniciativa “Buscando el Cacao de Oro de Perú”. USAID PERU/PDA. Lima. 17 p.

M&O Consulting. 2008. Estudio del Potencial Genético del Cacao en el Perú. Informe Final de Consultoría. Proyecto de Cooperación UE-Perú en Materia de Asistencia Técnica Relativa al Comercio - Apoyo al Programa Estratégico Nacional de Exportaciones (PENX 2003-2013). Lima. 132 p.

Zhang D., Arevalo E., Lambert A., Motilal et. al. 2011. Dissecting Genetic Structure in Farmer Selections of *Theobroma cacao* L. in the Peruvian Amazon: Implications for on Farm Conservation and Rehabilitation. *Tropical Plant Biol.* 4:106-116.

Homenaje póstumo

Continuamos en este segundo congreso de mejoramiento genético de plantas y biotecnología agrícola reconociendo y valorando el legado de nuestros fitomejoradores, quienes empezaron el camino de las colecciones, establecimiento de los bancos de germoplasma, implementación de los programas de mejoramiento y han dejado nuevas variedades para la humanidad. Agradecemos profundamente a los fitomejoradores por el servicio tan noble al país, promotores de toma de consciencia sobre el análisis, la conservación y el uso de los recursos genéticos. Al mismo tiempo, moldeadores de los genotipos para la obtención de nuevas variedades competitivas, de alto valor económico, que permiten responder a los retos de mercados más exigentes, al cambio climático y otros factores limitantes de la producción como las plagas y enfermedades, entre ellos hoy nos toca recordar a nuestro querido fitomejorador y profesor **Jorge Nakaodo**. Este reconocimiento póstumo, es un homenaje simbólico que hacemos a los maestros, mejoradores genéticos de plantas, por su trayectoria como investigadores, generadores de nuevas variedades y pioneros en la formación de los fitomejoradores en el país. Esperando que en los siguientes congresos de mejoramiento genético de plantas y biotecnología agrícola se institucionalice el premio al fitomejorador en plena actividad como parte de la valoración y estima del profesional agrícola, que finalmente redundará en la obtención de nuevos y mejores variedades para el país.

Roxana Bardales Alvarez
Presidente comisión organizadora

Jorge Yasuhiro Nakahodo

1943 – 2009



El Ing. Jorge Yasuhiro Nakahodo, nació en la ciudad de Lima el 02 de julio de 1943. Sus estudios de secundaria lo realizó en el Colegio Melitón Carbajal entre los años 1956 y 1960. El año 1970 ingresó a la Universidad Nacional Agraria La Molina ocupando el primer puesto de un total de 43 alumnos y culminaron sus estudios en el año 1975 como el primer alumno de su promoción, con el promedio ponderado general de 15.87 que no es muy frecuente en la UNALM. Durante sus estudios aunque está por demás decirlo fue sobresaliente en todos los cursos, aunque se interesó muy fuertemente por la genética y estadística. En 1978 se graduó como Ingeniero Agrónomo con la tesis titulada **“Evaluación de híbridos simples chocheros para siembras de verano en la costa central”**. El año 1983 recibió el grado de Magister Scientiae en Mejoramiento Genético de Plantas con la tesis **“Evaluación de la habilidad combinatoria general**

en dos compuestos de maíz (*Zea mays* L.)”.

El año 1978 ingreso a la docencia como Profesor Contratado Clase “C” en el Departamento de Fitotecnia. Cuatro años más tarde (1982) fue nombrado Profesor Auxiliar. El año 1986 asciende a la Categoría de Profesor Asociado y en 1992 a la categoría de Profesor Principal. Durante 30 años como docente de la UNALM se dedicó a enseñar Maíz y Sorgo, Agrotecnia, Fitomejoramiento General y Fitogenética, cursos de nivel de pre-grado. A nivel de post-grado nos dejó sus enseñanzas en los cursos de Diseños Experimentales, Análisis de Experimentos Genéticos, Mejoramiento Cuantitativo y de Poblaciones, Experimentación Agrícola Avanzada I y II, Estadística Experimental II, Biometría y Planeamiento de Experimentos. Fue un experto en estadística siguiendo la tradición dejada por profesores de la talla de José Calzada Benza, Walter Fegan Escobar y Alfredo García Goycochea.



El Ing. Nakahodo fué Jefe de la Oficina Académica de Proyección Social el año 1989, Jefe del Departamento Académico de Fitotecnia en el año 1993, Coordinador de la Especialidad de Mejoramiento Genético de Plantas y de la Especialidad de Producción y Extensión Agrícola, miembro activo del Programa Cooperativo de Investigación en Maíz – PCIM Coordinador del Proyecto de Mejoramiento de Maíz Tropical, Jefe del Programa de Investigación y Proyección Social en Maíz y miembro de la Sociedad Peruana de Genética.

La fructífera vida del Ing. Nakahodo fue interrumpida en Junio del 2009, mientras tanto, el Ing. Jorge Nakahodo no solamente cosechó maíz a lo largo de la extensa costa peruana sino también logró cosechar lo más importante que un hombre puede lograr “amigos” que lo hizo enseñando y acompañado siempre de una tiza, una coca cola y un cigarrillo. Por ello nuestro homenaje a este ilustre maestro (QEPD).