

**CARACTERIZACIÓN FISIOLÓGICA Y FITOSANITARIA DE LAS SEMILLAS
DE Sacha inchi (EUPHORBIACEAE: *Plukenetia volubilis*)**

CINDY JULIANA ACOSTA RAMIREZ



**UNIVERSIDAD DEL VALLE
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS
MAESTRÍA EN CIENCIAS-BIOLOGÍA**

SANTIAGO DE CALI

2018

**CARACTERIZACIÓN FISIOLÓGICA Y FITOSANITARIA DE LAS SEMILLAS
DE Sacha inchi (EUPHORBIACEAE: *Plukenetia volubilis*)**

CINDY JULIANA ACOSTA RAMIREZ

cindy.acosta@correounivalle.edu.co

Trabajo de investigación presentado como requisito parcial para optar al título de Magister
en Ciencias-Biología

Directora

NEYLA BENITEZ CAMPO, Ph.D.

Profesora Asociada

Departamento de Biología

Codirectora

ALBA MARINA TORRES GONZALEZ, Ph.D.

Profesora Asociada

Departamento de Biología

UNIVERSIDAD DEL VALLE

FACULTAD DE CIENCIAS

MAESTRÍA EN CIENCIAS-BIOLOGÍA

SANTIAGO DE CALI

2018

NOTA DE APROBACIÓN

El trabajo de investigación titulado “**CARACTERIZACIÓN FISIOLÓGICA Y FITOSANITARIA DE LAS SEMILLAS DE Sacha inchi (EUPHORBIACEAE: *Plukenetia volubilis*)**”, presentado por la estudiante CINDY JULIANA ACOSTA RAMIREZ, para optar al título de Magister en Ciencias-Biología, fue revisado por el jurado y calificado como:

APROBADO



NEYLA BENITEZ CAMPO, Ph.D.
Directora Trabajo de Investigación



ALBA MARINA TORRES, Ph.D.
Co-directora Trabajo de Investigación



ANA CRISTINA BOLAÑOS, Ph.D.
Jurado Interno



LUIS MIGUEL ALVAREZ, Ms.C.
Jurado Externo

Santiago de Cali, Abril de 2018

DEDICATORIA

A mi padre celestial, mi Dios, por darme la fuerza y la perseverancia en cada día de mi maestría y de mi vida.

A mi madre, por su amor, dedicación, trasnochos, confianza, motivación y por su apoyo incondicional en esta importante etapa de mi vida.

A Nelson, mi esposo, el amor de mi vida, gracias por su gran amor, por su infinita paciencia, su confianza, compañía y ayuda incondicional en esta etapa de mi vida.

A mi hija Samantha, por darme la fuerza y ser el motor para finalizar mi maestría.

A mi hermano, por su compañía y su apoyo en todos estos años.

A mi padre por el apoyo y confianza que me brindo en toda esta etapa de mi vida.

A mis suegros y mi cuñada Geraldin por su apoyo brindado y ayuda para poder culminar mi maestría.

A mi familia y amigos por brindarme todo su cariño y comprensión, además por acompañarme a alcanzar una de las metas más importantes de mi vida.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad del Valle por la excelente formación académica que me brindo.

Al posgrado por los apoyos económicos, un excelente programa y los profesores, quienes me brindaron las bases para mi formación académica.

A mis directoras, Neyla Benítez Campo y Alba Marina Torres González quienes me apoyaron y permitieron realizar este trabajo de investigación con éxito.

Al Laboratorio de imágenes del postgrado en Ciencias-Biología de la Universidad del Valle. Juan Felipe Ortega por la colaboración en la toma de imágenes.

A mis compañeros de maestría, a Diego Alexander Hernández y Diana Nataly Duque quienes me asesoraron en los análisis filogenéticos, a los compañeros del laboratorio LIM por su ayuda y apoyo brindado.

A mi familia, en especial a mi madre, ayuda incondicional, a mis suegros, mi cuñada Geraldín y amigos, por entender mis ausencias, brindarme todo su cariño y comprensión, además por acompañarme a alcanzar una meta más de mi vida.

A Nelson, mi querido esposo que siempre estuvo apoyándome, motivándome y ayudándome en todo momento, por ser un pilar fundamental en mi vida. A mi hija Samantha esa gran bendición que me dio el ímpetu para continuar.

Y a Dios quien me dio la fuerza y pasión para lograr, con sacrificio y entrega de todos estos años, ser quien soy hoy.

Muchas gracias a todos.

TABLA DE CONTENIDO

LISTA DE FIGURAS	VIII
LISTA DE TABLAS	X
1. RESUMEN.....	XI
1.1. ABSTRACT.....	xiii
2. INTRODUCCION GENERAL.....	15
4. CAPITULO 1: CARACTERIZACIÓN FISIOLÓGICA DE LAS SEMILLAS:.....	19
4.1. RESUMEN	19
4.2. INTRODUCCIÓN.....	19
4.3. OBJETIVOS:	22
4.3.1. OBJETIVO GENERAL	22
4.3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	22
4.4. METODOS.....	22
4.4.1. Material vegetal.	22
4.4.2. Humedad de la semilla.	22
4.4.3. Rompimiento de latencia.	23
4.4.4. Efecto de la calidad de la luz y la temperatura en la germinación.	23
4.4.5. Efecto de la temperatura y humedad en el almacenamiento de las semillas.	24
4.4.6 Análisis de datos.	25
4.5. RESULTADOS.....	26
4.5.1. Rompimiento de latencia.	26
4.5.2. Efecto de la calidad de la luz y la temperatura en la germinación.	30
4.5.3. Comportamiento de las semillas en el almacenamiento.	31
4.6. DISCUSIÓN	31
4.6.1. Rompimiento de latencia.....	31
4.6.2. Efecto de la calidad de la luz y la temperatura en la germinación.	32
4.6.3. Comportamiento de las semillas en el almacenamiento.	34
4.7. LITERATURA CITADA.....	35

5. CAPITULO 2: CARACTERIZACIÓN SANITARIA DE LAS SEMILLAS DE <i>P. VOLUBILIS</i>	40
5.1. RESUMEN	40
5.2. INTRODUCCIÓN	40
5.3. OBJETIVOS	41
5.3.1. OBJETIVO GENERAL	41
5.3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	41
5.4. MÉTODOS	42
5.4.1. Material vegetal.	42
5.4.2. Sanidad de las semillas.	42
5.4.3. Aislamiento de los microorganismos presentes en la semilla y posibles patógenos.	42
5.4.4. Tratamiento de las muestras	43
5.4.5. Pruebas de patogenicidad	44
5.4.6. Obtención de secuencias para identificación molecular de microorganismos.	45
5.4.7. Análisis de datos moleculares.	46
5.4.8. Análisis estadístico.	47
5.5. RESULTADOS	47
5.5.1. Tipos de microorganismos cultivables encontrados en los cuatro tratamientos.	47
5.5.2. Microorganismos fitopatógenos y síntomas causados en plántulas de <i>P. volubilis</i>	51
5.5.3. Inferencia filogenética para bacterias y hongos patógenos aislados de semillas de <i>P. volubilis</i>	57
5.6. DISCUSIÓN	66
5.7. LITERATURA CITADA	71
6. CONCLUSIONES GENERALES	75
7. RECOMENDACIONES	76
8. LITERATURA GENERAL CITADA	77
9. ANEXOS	80

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Montaje del experimento para tratamiento calidades de luz en las semillas, A. Cámara oscura, B. Incubadora DiEs con las muestras de las semillas con bolsas transparentes y bolsas negras de polietileno de alta densidad (PEAD), C. Filtro Lee 120, D. Filtro Lee 026.....	24
Figura 2. Respuesta de la germinación de semillas de <i>Plukenetia volubilis</i> a tratamientos de escarificación y temperatura alternada. Las barras verticales muestran la desviación estándar.	27
Figura 3. Respuesta de la velocidad de germinación de semillas de <i>Plukenetia volubilis</i> a tratamientos de escarificación y temperatura alternada (A), Figura de Interacción entre tratamientos y temperatura (B), Las barras verticales muestran la desviación estándar.....	28
Figura 4. Microorganismos observados en las semillas de <i>Plukenetia volubilis</i> durante las pruebas de germinación.....	29
Figura 5. Presencia de Antocianinas en las semillas de <i>Plukenetia volubilis</i> tratadas con luz Roja Lejana después del contacto con la luz y semillas tratadas con luz Roja.	29
Figura 6. Respuesta de la germinación de semillas de <i>Plukenetia volubilis</i> a tratamientos de luz y temperatura alternada (A) Interacción entre tratamientos y temperatura (B). Las barras verticales muestran la desviación estándar (1=100%).	30
Figura 7. Comportamiento de las semillas de <i>Plukenetia volubilis</i> en diferentes condiciones de almacenamiento (1=100%).	31
Figura 8. Diagrama de barras con intervalos del 95% de confianza (A) y diagrama de interacciones (B) para el número promedio de hongos en las semillas tomando en cuenta el proceso de escarificación y desinfección.	49
Figura 9. Relaciones filogenéticas de los géneros bacterianos obtenidos por el método de máxima verosimilitud.....	58
Figura 10. Árbol que presenta los clados principales y asociaciones específicas del género <i>Paenibacillus</i> . La cepa aislada se indica con el punto amarillo.	58
Figura 11. Árbol que presenta los clados principales y asociaciones específicas del género <i>Bacillus</i> . Las cepas aisladas se indican por puntos amarillos.	59

Figura 12. Relaciones filogenéticas de los géneros de hongos obtenidas por el método de máxima verosimilitud.....	60
Figura 13. Relaciones filogenéticas obtenidas de los clados en los que se ilustra la relación entre los aislamientos obtenidos y las especies fúngicas del género <i>Aspergillus</i> . Las cepas aisladas se indican con puntos azules.....	61
Figura 14. Relaciones filogenéticas obtenidas de los clados en los que se ilustra la relación entre los aislamientos obtenidos y las especies fúngicas del género <i>Lasiodiplodia</i> . Las cepas aisladas se indican con puntos azules.....	62
Figura 15. Relaciones filogenéticas obtenidas de los clados en los que se ilustra la relación entre los aislamientos obtenidos y las especies fúngicas del género <i>Curvularia</i> . Las cepas aisladas se indican con puntos azules.....	63
Figura 16. Relaciones filogenéticas obtenidas de los clados en los que se ilustra la relación entre los aislamientos obtenidos y las especies fúngicas del género <i>Hypoxylon</i> . Las cepas aisladas se indican con puntos azules.....	64
Figura 17. Relaciones filogenéticas obtenidas de los clados en los que se ilustra la relación entre los aislamientos obtenidos y las especies fúngicas del género <i>Fusarium</i> . Las cepas aisladas se indican con puntos azules.....	65
Figura 18. Relaciones filogenéticas obtenidas de los clados en los que se ilustra la relación entre los aislamientos obtenidos y las especies fúngicas del género <i>Colletotricum</i> . Las cepas aisladas se indican con puntos azules.....	65

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Tratamientos de luz y temperatura para la prueba de germinación.....	24
Tabla 2. Tratamientos de las semillas para la prueba de almacenamiento.	25
Tabla 3. Respuesta de la velocidad de germinación de semillas de <i>Plukenetia volubilis</i> a tratamientos de escarificación y temperatura alternada.....	27
Tabla 4. Tratamientos de las semillas para la prueba de sanidad.	42
Tabla 5. Microorganismos presentes en las semillas de <i>P. volubilis</i> por tratamiento.	47
Tabla 6. Tabla de Análisis de Varianza (ANOVA) para el modelo ajustado con interacción escarificación y desinfección para el número de hongos en las semillas.	50
Tabla 7. Agrupación de tratamientos para la prueba Post – ANOVA de Tukey utilizando un nivel de confianza del 95%.....	50
Tabla 8. Descripción de los hongos patógenos encontradas en las semillas de <i>Plukenetia volubilis</i> , sacha inchi.....	51
Tabla 9. Descripción de las bacterias patógenas encontradas en las semillas de <i>Plukenetia volubilis</i> , sacha inchi.....	54
Tabla 10. Resumen de los microorganismos aislados e identificados presentes en la semillas de <i>P. volubilis</i>	55
Tabla 11. Síntomas observados en las plantas de <i>P. volubilis</i> causados por las cepas de hongos que resultaron patógenas.....	56
Tabla 12. Síntomas observados en las plantas de <i>P. volubilis</i> causados por las cepas bacterianas que resultaron patógenas.	57

1. RESUMEN

El Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis* L.) es una planta nativa de la Amazonía, conocida también como maní del monte, sachá inchik y maní del inca, es una especie de importancia para la agroindustria de aceites, ya que se ha encontrado gran producción de ácidos grasos polinsaturados tipo omega (3, 6 y 9) en sus semillas. Dada su potencial producción es primordial la caracterización fisiológica de las semillas y el análisis fitosanitario, que permita determinar el comportamiento germinativo, identificar y determinar la proporción de microorganismos asociados a las semillas. Los microorganismos pueden ser transportados adheridos a la superficie de la semilla, en su interior o como parte del material inerte. Se midió la capacidad de germinación de *P. volubilis*, bajo diferentes condiciones de temperaturas (25/35 y 20/30° C), con o sin imbibición, con y sin escarificación, a diferentes intensidades de luz (luz blanca, oscuridad total, pulso de luz a baja y alta relación con rojo lejano), y se realizó una prueba de conservación *ex situ* de semillas. Se evaluó la sanidad de la semilla para lo cual se utilizaron cuatro tratamientos (con testa-con desinfección, con testa-sin desinfección, sin testa-con desinfección y sin testa-sin desinfección), en cajas de Petri con medio de cultivo PDA (Papa-Dextrosa-Agar), con el propósito de identificar microorganismos macro y microscópicamente. Además, se evaluó la posible patogenicidad de los microorganismos, utilizando los postulados de Koch. La germinación de *Plukenetia volubilis* fue indiferente a las intensidades de luz y a la variación de las temperaturas probadas. Se espera que en las condiciones ambientales naturales en Sacha Inchi, las semillas germinen tanto en oscuridad, penumbra y condiciones de luminosidad. Las semillas de *Plukenetia volubilis* son ortodoxas, por lo cual resisten deshidratación y bajas temperaturas. Estas características hacen que con esta se puedan formar bancos de semillas tanto *in situ* como *ex situ*. Se encontraron 24 cepas diferentes de hongos y 29 cepas bacterianas, dentro de las cuales se corroboró como hongos patógenos especímenes de los géneros *Fusarium* sp., *Aspergillus* sp., *Lasiodiplodia* sp., *Curvularia* sp., *Colletotrichum* sp.

e Hypoxylon sp. En cuanto a las bacterias se reportaron los géneros *Bacillus sp.* y *Paenibacillus sp.* como patógenos de las semillas con posible efecto sobre el cultivo.

Palabras claves: Antocianinas, Escarificación, Desinfección, Fito patología, Luz Rojo y Rojo Lejano.

1.1. ABSTRACT

Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis* L.) It's a native plant from the Amazon, known as mountain peanuts, sacha inchik and Inca peanuts. It is a species of great importance for the agribusiness of oils, it has already been found great production Of oil omega-type polyunsaturated fatty acids (3, 6 and 9) in their seeds. Due to its potential production, the biological characterization of the seeds and the phytosanitary analysis, which allowed to determine the germinative behavior and to identify the microorganisms associated to the seeds, is of prime importance. These microorganisms can be transported adhered to the surface of the seed, either inside or as part of the inert material. The germination capacity of *P. volubilis*, under different germination conditions, germination percentage at different temperatures (25/35 and 20/30 ° C), with or without imbibition, with and without scarification, at different intensities Of light (white light, without light, light pulse at low and high relation with far red), proof of conservation, among others; In addition, the health of the seed was evaluated for which four treatments were used (with testa-with disinfection, with testa-without disinfection, without testa-with disinfection and without testa-without disinfection), in Petri dishes with PDA culture medium (Potato-Dextrose-Agar), in order to identify microorganisms macro- and microscopically, as well as to test the possible pathogenicity of microorganisms, using Koch's postulates. We found 24 different morphic species of fungi and 29 bacterial strains, in which specimens of the genera *Fusarium sp.*, *Aspergillus sp.*, *Lasiodiplodia sp.*, *Curvularia sp.*, *Colletotrichum sp.* and *Hypoxylon sp.* were corroborated as pathogenic fungi *Bacillus sp.* and *Paenibacillus sp.* genera were reported as pathogens of the seeds with possible effect on the culture. It was concluded that sacha inchi seeds (*P. volubilis*) behave as orthodox and can be easily conserved, therefore it can be predicted that these seeds have a high longevity both in ex situ conditions and in situ conditions of Seed banks. It is important to note that the seed of *Plukenetia volubilis* can properly produce anthocyanins by the effect of red light exposure that serves as an antioxidant of its polyunsaturated oils.

Keywords: Anthocyanins, Disinfection, PhytoPathology, Red and Red Far Light, Scarification.

2. INTRODUCCION GENERAL

Plukenetia volubilis L., comúnmente conocido como Sacha inchi, maní del inca o maní del monte perteneciente a la familia Euphorbiaceae, crece en climas cálidos, hasta 1500 m de altitud y es una enredadera leñosa oleaginosa, originaria de la selva tropical del Amazonas. Los frutos son cápsulas con 4-7 lóculos con una semilla por lóculo. En los bosques tropicales, *P. volubilis* crece a la sombra de un dosel, pero para producción comercial, normalmente se cultiva en terrenos despejados (Cai, 2011). Las semillas de Sacha inchi tienen alto contenido de proteínas (27-30%) y aceite (40-60%), es rico en vitaminas E y A (Gutiérrez *et al.* 2011 y Fu *et al.* 2014). El aceite de *P. volubilis* tiene un gran potencial económico en cosmética, farmacéutica y las industrias de alimentos por su contenido de ácidos grasos poliinsaturados, Omega 3, 6 y 9, los cuales son esenciales para la vida humana (Cai, 2011, Chirinos *et al.* 2013 y Fu *et al.* 2014). Además de su valioso aceite presenta otros compuestos bioactivos, como los tocoferoles, carotenos, compuestos polifenólicos (Fanali *et al.* 2011) y fitoesteroles. Numerosos beneficios para la salud han sido atribuidos a los fitosteroles, tocoferoles, carotenoides y compuestos fenólicos, a los fitoesteroles se les atribuye la reducción del colesterol en la sangre y la disminución del riesgo de ciertos tipos de cáncer (Lagarda *et al.* 2006, Garmendia *et al.* 2011). Los tocoferoles muestran una fuerte actividad antioxidante, que confiere protección contra la peroxidación de lípidos en los tejidos biológicos y en alimentos. Los carotenoides y compuestos fenólicos son considerados como promovedores de la salud humana (Chirinos *et al.* 2013).

Las semillas de Sacha inchi se utilizan en diferentes formas por la población amazónica. El aceite se utiliza en la preparación de diversas comidas, las semillas se consumen tostadas y las hojas se cocinan y se consumen como alimento (Fanali *et al.* 2011). Estas semillas también se utilizan como un remedio tradicional en la región amazónica para tratar problemas reumáticos y dolores musculares (Chirinos *et al.* 2013). Además, el aceite de *P. volubilis* se considera como un posible recurso para la producción de biocombustibles (Zuleta *et al.* 2012).

El cultivo de *P. volubilis* constituye una posibilidad de industrialización y presenta un potencial de rendimiento económico que podría reemplazar en alguna medida al cultivo de coca, pero es indispensable implementar las investigaciones en mejoramiento genético, principalmente en aspectos de biología floral, resistencia a plagas y enfermedades, resistencia a la humedad y al stress hídrico (Manco, 2006).

La influencia de los factores abióticos como la luz, la temperatura y el sustrato sobre la germinación es información esencial en el estudio de semillas, en muchos casos la germinación se puede ver inhibida por uno o varios de estos factores (Escobar y Torres 2013 y Ávila *et al.* 2015). La biología reproductiva de las plantas (la producción, la dispersión y la germinación de sus semillas) constituye un elemento clave en el esclarecimiento de la distribución, abundancia de una especie y a nivel industrial el mantenimiento exitoso de un cultivo. La labor que deben realizar las semillas para nutrir y proteger el embrión de patógenos, pero al mismo tiempo permitir que tenga interacción con los nutrientes del suelo genera presiones selectivas que afectan el tiempo de germinación y los requerimientos para que esto ocurra, Dalling (2002). Las semillas de diversas especies pueden variar en tamaño, forma, estructura del embrión y presencia de tejidos de almacenamiento. En el caso de *P. volubilis* presenta una semilla grande, con testa dura y abundante endospermo. De estos, el tamaño de la semilla es considerado un factor importante en la ecología de la especie; este factor puede influir sobre la velocidad de germinación y una serie de atributos de la plántula (Arteaga *et al.* 2007 y Dalling, 2002).

Torres M, 2012 realizó un estudio con semillas de *P. volubilis* donde demostró que la escarificación y la imbibición aumentan el porcentaje y la velocidad de germinación en estas semillas. Manco 2006 reportó que las semillas expuestas a altas temperaturas, superiores a 35°C pueden afectar considerablemente la germinación de las semillas y la eficiencia del cultivo.

El mantenimiento de la longevidad de las semillas en bancos *in situ* o *ex situ* depende de las condiciones ambientales y de la fisiología de las mismas en el almacenamiento, donde la temperatura juega un papel clave en dichos procesos, ya que ésta afecta el deterioro, la

latencia y el vigor de las semillas (Posada *et al.* 2014). La mayoría de las semillas tienen un comportamiento ortodoxo (Hong y Ellis, 1996), lo que significa que pueden secarse hasta contenidos bajos de humedad, sin dañarse y tienen longevidad alta en condiciones de bajas temperaturas. Sin embargo, el comportamiento recalcitrante es menos frecuente, corresponde a semillas que no sobreviven a la deshidratación ni a bajas temperaturas, cuyo mantenimiento de la viabilidad de estas semillas con comportamiento intermedio o recalcitrante es problemático para la conservación *ex situ* y por esta razón que los bancos de germoplasma preservan mayor cantidad de semillas ortodoxas, cerca del 90% (Rao *et al.* 2007). Finalmente, otras semillas tienen un comportamiento intermedio, y no sobreviven a temperaturas bajas cuando son deshidratadas (Vargas *et al.* 2015).

Las enfermedades de las plantas son un factor determinante y de gran importancia en los cultivos con un promisorio valor económico. Estas enfermedades pueden estar causadas por agentes bióticos principalmente hongos y bacterias, con menor proporción de virus, fitoplasmas, nemátodos, insectos entre otros, o agentes abióticos, que alteran el normal funcionamiento de las plantas y pueden resultar en una enfermedad (Jacas *et al.* 2005). Las enfermedades y plagas en este cultivo han ocasionado daños en raíz, hojas, tallos y frutos disminuyendo considerablemente la producción del cultivo, sin embargo, se puede anticipar a los daños que pudieran ocasionar, con un diagnóstico fitosanitario en las parcelas ya instaladas del cultivo para determinar las plagas y enfermedades, información que sirve de base para establecer estrategias de prevención y de manejo (Layme y Tafur, 2008).

Investigaciones propiamente en la especie de estudio (*P. volubilis*) son pocas, como la realizada por Layme y Tafur (2008), los cuales investigaron sobre las plagas y enfermedades del cultivo de sacha inchi (*P. volubilis*) encontrando *Rhizoctonia sp.*, *Cercospora sp.*, *Aureobasidium sp.*, y *Cladosporium sp.*, para mancha foliar y *Fusarium sp.*, para pudrición radicular, este último, también reportado por Manco 2006 como generador de daños considerables a los cultivos de *P. volubilis*.

Uno de los puntos o factores importantes en cultivos con un alto valor económico y comercial, como el de *P. volubilis*, es conocer la biología de estas especies. El

conocimiento de sus características fisiológicas y ecológicas permitirá optimizar la productividad del cultivo (Vargas *et al.* 2015). Para lograr un proceso rápido y eficiente, es indispensable el conocimiento de los factores limitantes de la germinación de las semillas, como la temperatura, la exposición a la luz, la forma de conservación, entre otras, con el fin de lograr una eficiencia en el establecimiento de estos cultivos.

El propósito de este estudio fue caracterizar fisiológica y fitosanitariamente las semillas de *Plukenetia volubilis*, con los siguientes objetivos específicos: a) determinar el efecto de la luz y la temperatura en la germinación de semillas de *P. volubilis*, b) evaluar el comportamiento de las semillas de *P. volubilis* en el almacenamiento de acuerdo a la temperatura, humedad y tiempo, c) estimar la posible patogenicidad de los microorganismos aislados en las semillas de *P. volubilis*, d) identificar morfológica y molecularmente los microorganismos patógenos en semillas de *P. volubilis*.

3. HIPOTESIS

Para el desarrollo de esta investigación se plantean las siguientes hipótesis: (a) La germinación de semillas de *Plukenetia volubilis* es estimulada por alguna de las diferentes calidades de luz y de las temperaturas alternadas. (b) Las semillas de *P. volubilis* tienen un comportamiento ortodoxo en el almacenamiento. (c) Las semillas de *P. volubilis* presentan microorganismos fitopatógenos causantes de enfermedades en estas plantas.

4. CAPITULO 1: CARACTERIZACIÓN FISIOLÓGICA DE LAS SEMILLAS:

4.1. RESUMEN

La caracterización fisiológica de las semillas de *P. volubilis* se realizó sometiendo a diferentes temperaturas y calidades de luz, además si estas soportaban ciertas condiciones de almacenamiento, en donde se variaba la temperatura, la humedad y el tiempo. Se encontró que la mayoría de las semillas de *P. volubilis* presentaron porcentajes de germinación entre 80-100% por ende se espera que en las condiciones ambientales naturales del cultivo de Sacha Inchi, las semillas germinen tanto en oscuridad, penumbra y condiciones de luminosidad. Las semillas de *Plukenetia volubilis* son ortodoxas, por lo cual resisten deshidratación y bajas temperaturas. Estas características hacen que con esta se puedan formar bancos de semillas tanto *in situ* como *ex situ*.

4.2. INTRODUCCIÓN

Morfología

P. volubilis es una planta trepadora, voluble, semileñosa con hábito de crecimiento indeterminado, en cuanto a sus hojas, son alternas de forma acorazonada de 10 a 12 cm de largo y de 8 a 10 cm de ancho, elípticos, aserrados y con pecíolos de 2 a 6 cm de largo. Las nervaduras nacen en la base de la nervadura central orientándose al ápice (Tasso *et al.*, 2013). El fruto tiene forma de estrella, con número variable de lóbulos que pueden ir desde cuatro hasta ocho, predominando aquellos que tienen cuatro o cinco lóbulos. Estos frutos se dividen cuando esté madura y se diferencia, endureciendo sus paredes. Cuando el fruto madura, en su interior se hallan las semillas de color marrón oscuro, corrugadas y venadas, de forma lenticular con 1.5 a 2 cm de diámetro (Gómez *et al.*, 2005).

Distribución geográfica

Sacha inchi se ha encontrado desde América Central hasta Bolivia, en América del Sur se ha registrado en la Amazonía peruana, boliviana y en las Antillas. En Perú están distribuidos principalmente en las zonas selváticas de los departamentos de San Martín, Ucayali y Loreto. En Colombia se encuentra en estado silvestre en diversos lugares de la

Orino-Amazonia y en el pacífico. Se tienen reportes de cultivo en el departamento del Chocó, en el Putumayo, Caquetá y en el Amazonas, y en los municipios de Fresno Tolima y Tibacuy Cundinamarca (Chirinos *et al.*, 2013).

Importancia económica

El género *Plukenetia sp.* (Euphorbiaceae), se caracteriza porque presenta plantas con una importancia económica ya que se obtienen productos tales como el caucho, la tapioca, ceras y aceites. Este género comprende 17 especies, 12 en América, 3 en África, una en Madagascar y una en Asia (Jiménez *et al.*, 2000). Algunas especies de esta familia son consideradas semillas ortodoxas con necesidades de luz y sin exigencias rigurosas de otros factores como el agua, temperatura, humedad (Carvalho *et al.*, 2006), lo cual indica buena germinación y proyección del cultivo.

Se han realizado diferentes estudios en *P. volubilis* orientados a la composición química y fitoquímica de sus semillas, en especial de sus aceites (Cai, 2011, Chirinos *et al.* 2013.). Un posible uso del aceite de Sacha inchi es como biocombustible, no obstante recientemente se ha confirmado como inhibidor de *Staphylococcus aureus* usado en células dérmicas de piel humana (González *et al.* 2015). Todos estos estudios se han realizado con el objetivo de ofrecer más información sobre las propiedades funcionales de las semillas de *P. volubilis* para promover el consumo en los mercados locales e internacionales dado sus propiedades e importancia económica.

Fisiología de las semillas

La latencia o letargo, es un estado natural de las semillas que les brinda un mecanismo de supervivencia o adaptación frente a las diferentes condiciones ambientales, esto ocurre cuando una semilla madura y viable no germinan así como con las condiciones favorables para su desarrollo (Varela y Arana 2011). Existen múltiples mecanismos y tratamientos para romper estas barreras permitiendo aumentar las tasas de germinación tanto en laboratorio como en campo (Ospina *et al.*, 2000). En *Plukenetia volubilis* se conoce poco sobre la longevidad, germinación y la eficiencia de sus semillas, en cultivo, se tienen datos que dan a entender que es una semilla poco exigente por su distribución y fácil manejo.

Manco 2006 registró que en un rango superior de temperatura hay dificultades para la germinación de las semillas de *P. volibilis*, ya que se encuentran pocos datos sobre la germinación de *P. volibilis*, la yuca, *Manihot esculenta Crantz.* que pertenece a la misma familia Euphorbiacea, presenta dificultades en su proceso de germinación sexual (por semillas) ya que la latencia de sus semillas en general no le permite la rápida germinación, aunque al tratarlas con mecanismos para romper las barreras de la latencia se comporta como una semilla ortodoxa (Ospina *et al.*, 2000).

VARIABLES AMBIENTALES QUE AFECTAN A LAS SEMILLAS

La exposición de las semillas a variaciones tanto en la calidad de la luz incidente como en la temperatura permite en ciertos casos promover la germinación de las mismas. El cambio en la luminosidad del medio puede ejercer un control positivo o negativo en la germinación, lo que finalmente actúa como un factor determinante del establecimiento y sobrevivencia de las plántulas. La cantidad de luz incide en el desarrollo de las semillas, ya que su presencia o ausencia generan respuestas que van a determinar la germinación o no de las plántulas. Otro factor que influye sobre la germinación de las semillas es la temperatura, la cual genera estrés físico y dependiendo de su intensidad, puede resultar en procesos de germinación exitosos o no. El efecto de la temperatura y de las calidades de luz afecta a algunas especies vegetales, siendo la temperatura y la ausencia total de la luz los factores más limitantes en la germinación (Vargas *et al.* 2015). Estos dos factores (luz y temperatura) generan variaciones significativas en la germinación de las semillas de diversas especies, ya que, en ciertos escenarios, la luz puede reemplazar por completo los efectos dados por alternancia de temperaturas, mientras que, en otros, el efecto de la luz se reduce solamente al disminuir la amplitud necesaria en los cambios de temperatura para que la germinación se lleve a cabo (Fenner y Thompson, 2005). Por ejemplo, en una especie del bosque húmedo, *Alibertia patinoi*, los porcentajes de germinación fueron altos en condiciones de luz y temperatura específicas al hábitat de esta especie, y la luz enriquecida con rojo lejano y la oscuridad no inhibieron la germinación (Escobar y Torres 2013).

Son muy pocas las investigaciones sobre las características fisiológicas de la semilla de *P. volubilis*. La germinación de *P. volubilis* en diferentes sustratos con adición de micorrizas se probó para rectificar las condiciones agroclimáticas del cultivo en Montería, siendo viable para cultivar en el Sinú Medio (Pérez 2014) y Manco 2016, quien registró que las altas temperaturas ambientales afectan la germinación en *P. volubilis*. Por lo anterior, se hace necesario el estudio de los factores que promueven la germinación como las calidades de luz y la temperatura de las semillas de *P. volubilis*, además la posibilidad de almacenamiento de estas semillas.

4.3. OBJETIVOS:

4.3.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la capacidad de germinación de *Plukenetia volubilis* bajo diferentes condiciones de luz, temperatura y almacenamiento.

4.3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Determinar el efecto de la luz y la temperatura en la germinación de semillas de *P. volubilis*.
2. Evaluar el comportamiento de las semillas de *P. volubilis* en el almacenamiento de acuerdo a la temperatura, humedad y tiempo.

4.4. METODOS

4.4.1. Material vegetal. Las semillas de Sacha inchi (*Plukenetia volubilis*), fueron recolectadas en un cultivo pequeño de propagación en la Finca Samanuran (Los Samanes de Urantia), ubicada a 987 de altitud, municipio de Cali, Valle del Cauca (3°21'10.3" N - 76°30'36.8" W). Las semillas se procesaron y almacenaron en el Laboratorio de Semillas de la Universidad del Valle.

4.4.2. Humedad de la semilla. Se determinó el contenido de humedad de los lotes de semillas con la prueba de humedad a alta temperatura, siguiendo las reglas del International Seed Testing Association (ISTA 1999).

4.4.3. Rompimiento de latencia. Las pruebas de germinación de semillas de *P. volubilis* se llevaron a cabo en hojas de papel de germinación enrollados. Se realizaron cuatro repeticiones de 10 semillas cada una. El primer tratamiento consistió en semillas sin escarificación y sin imbibición (control seco). El segundo tratamiento consistió en escarificación de semillas con bisturí seguida de imbibición en agua desionizada por 24 horas. El tercer tratamiento consistió en escarificación sin imbibición. La germinación se realizó a (20/30 °C - 8/16 h, 25/35 °C - 8/16 h), temperaturas que simularon las condiciones del hábitat natural de *P. volubilis*.

4.4.4. Efecto de la calidad de la luz y la temperatura en la germinación. Debido a la latencia física de *P. volubilis* y a la insensibilidad del fitocromo a la luz cuando las semillas están deshidratadas (McCullough y Shropshire, 1970; Kendrick y Spruit, 1977), se hizo necesario que antes de las pruebas todas las 320 semillas se escarificaran y fueran embebidas en agua desionizada durante 24 horas en condiciones de oscuridad. La variable de respuesta fue emergencia de la radícula (> 1 mm), que se registró cada 3 días, se registraron los datos por 12 días, momento en el cual se dio por terminada la prueba. Las 320 semillas se repartieron en los 8 tratamientos siguiendo un experimento factorial de 2x4 desbalanceado que consistió en (1) dos temperaturas alternadas (20/30 °C - 8/16 h, 25/30 °C - 8/16 h), y (2) cuatro calidades de luz (fotoperiodo de 16 horas de luz blanca, oscuridad total, un pulso de luz de una hora con alta relación rojo:rojo lejano (R), y un pulso de luz de una hora con baja relación rojo:rojo lejano (RL)) (Tabla 1). Los pulsos luz R y RL se aplicaron una sola vez a las semillas en cada tratamiento antes de su ingreso en las incubadoras (Escobar y Torres, 2013). Para el fotoperiodo y la alternancia de temperaturas se utilizaron incubadoras DiEs (K115U y KU115F). Para obtener oscuridad total se utilizaron bolsas negras de polietileno de alta densidad (PEAD). Para simular la luz roja (640-670 nm, pico en 660 nm) se usaron dos tubos fluorescentes de luz blanca de 20w (Sylvania F20T12/D) con irradianza de 100.1 $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$ y R:RL=0.00102; para simular la luz roja lejana (690-748nm, pico en 730nm) se utilizaron dos capas de Filtro Lee 26 y una capa de Filtro Lee 120, los cuales filtran la luz producida por dos bombillos incandescentes de 60w (Sylvania E-27) con irradianza de 3.31 $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$ y R:RL=5.40045 (Benvenuti,

Macchia y Miele, 2001; Escobar y Torres, 2013, Vargas *et al.* 2015). Los tratamientos de luz R y RL se realizaron en una cámara oscura de madera (Figura 1).

Tabla 1. Tratamientos de luz y temperatura para la prueba de germinación.

FACTORES	NIVELES
TEMPERATURA	20/30 °C
	25/30 °C
TIPOS DE LUZ	Luz blanca
	Rojo (R)
	Rojo Lejano (RL)
	Oscuridad

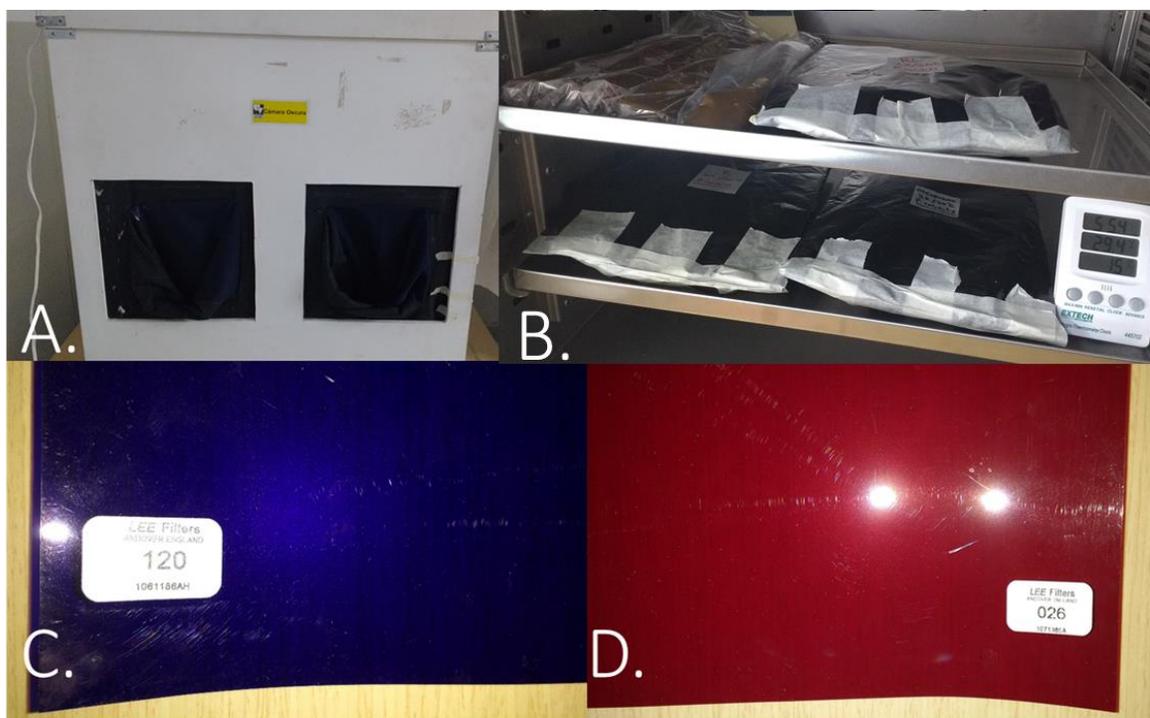


Figura 1. Montaje del experimento para tratamiento calidades de luz en las semillas, A. Cámara oscura, B. Incubadora DiEs con las muestras de las semillas con bolsas transparentes y bolsas negras de polietileno de alta densidad (PEAD), C. Filtro Lee 120, D. Filtro Lee 026.

4.4.5. Efecto de la temperatura y humedad en el almacenamiento de las semillas. Se evaluó el comportamiento de las semillas de *P. volubilis* siguiendo el protocolo por Hong y Ellis (1996). Se realizó un experimento factorial de 3x2x2 para un total de 12 tratamientos, (Tabla 2) que consistió en: (1) tres temperaturas de almacenamiento (20, 5 y -20°C), (2) dos

contenidos de humedad de la semilla (3% y 7 %), y (3) dos tiempos de almacenamiento (1 y 3 meses). La deshidratación de las semillas se realizó en una campana de vacío con sílica gel. De las 600 semillas procesadas se separaron por tratamiento, 40 semillas por cada tratamiento, para un total de 480 semillas, las cuales se empacaron en bolsas de aluminio herméticamente selladas con una extractora de vacío Fuji impulse.

Tabla 2. Tratamientos de las semillas para la prueba de almacenamiento.

FACTORES	NIVELES
TEMPERATURA	-20 °C
	5 °C
	20 °C
HUMEDAD	3 %
	7%
TIEMPO	1 MES
	3 MESES

Para determinar la viabilidad de las semillas en cada tratamiento de almacenamiento, se realizaron pruebas de germinación inmediatamente después de terminar cada tiempo de almacenamiento y se realizaron pruebas de germinación con cuatro repeticiones de 10 semillas cada una, se dispusieron las semillas en hojas de papel de germinación enrolladas, a una temperatura alternada de 25/35 °C. Se registró el número de semillas germinadas al final de la prueba y la variable de respuesta fue emergencia de radícula. La prueba tuvo una duración de 15 días.

4.4.6 Análisis de datos. Para los datos se hizo la transformación $\text{sen}^{-1}(\sqrt{y_{ijk}})$ y su resultado en unidades radianes y angulares. Se calculó el porcentaje de germinación (PG), la velocidad o tasa media de germinación (\bar{v}), el tiempo medio de germinación (\bar{t}) (Ranal y Santana, 2006) y para los datos de germinación en oscuridad, R y RL se calculó sólo el PG.

Los datos fueron analizados con el programa Minitab® 17, Software de Minitab Inc. Se realizó un análisis de varianza de acuerdo a la estructura de los diseños experimentales planteados, se trabajó con los datos transformados con el arcoseno y con los datos sin transformación. La validación de supuestos de normalidad se realizó de forma gráfica, se comprobó la significancia del supuesto de normalidad con la prueba Shapiro – Wilk y la

significancia del supuesto de homocedasticidad se comprobó mediante la prueba de Bartlett, asumiendo en ambos casos un nivel de significancia del 95% ($\alpha=0.05$).

Para analizar el efecto de la temperatura y la luz sobre el porcentaje de germinación, se realizó un análisis de varianza para el cual se planteó el siguiente modelo

$$y_{ijk} = \mu + \tau_i + \alpha_j + (\tau\alpha)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

En la cual, y_{ijk} es el porcentaje de germinación debida a la i – *esima* temperatura y el j – *esimo* tipo de luz para la k – *esima* réplica, μ es la media general, τ_i es el efecto de la i – *esima* temperatura y α_j es el efecto del j – *esimo* tipo de luz sobre el porcentaje de germinación, respectivamente. Además, $(\tau\alpha)_{ij}$ representa el efecto de interacción y ε_{ijk} es el error aleatorio experimental que se asume sigue una distribución normal con media cero y varianza constante σ^2 para todo $i = 1,2$ temperaturas, $j = 1,2,3,4$ tipos de luz y $k = 1,2,3,4$ réplicas.

4.5. RESULTADOS

4.5.1. Rompimiento de latencia. Las dos temperaturas alternadas probadas y los tratamientos de escarificación con y sin imbibición promovieron la germinación alcanzado PG de 100% en la mayoría de los tratamientos (Tabla 3 y Figura 2).

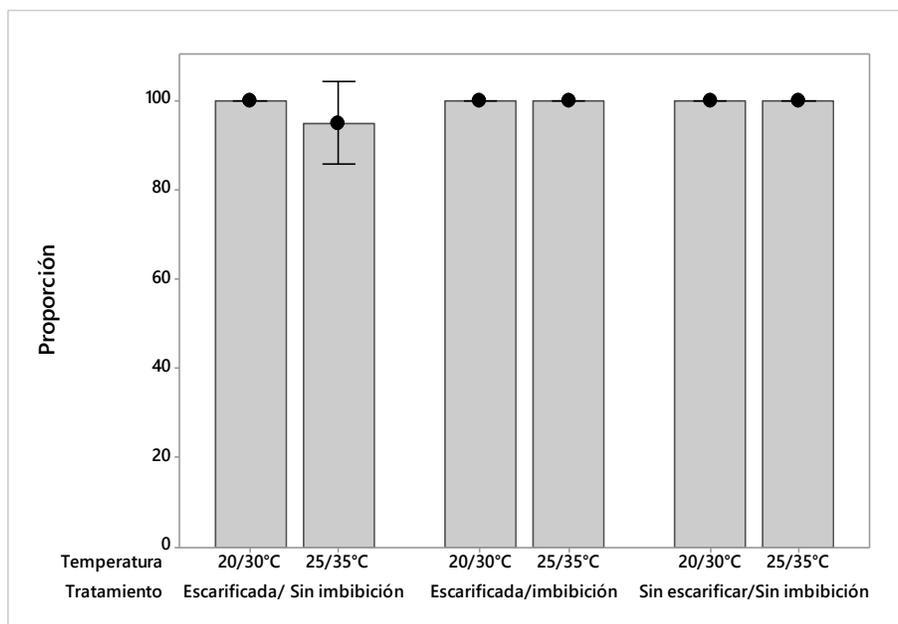


Figura 2. Respuesta de la germinación de semillas de *Plukenetia volubilis* a tratamientos de escarificación y temperatura alternada. Las barras verticales muestran la desviación estándar.

Tabla 3. Respuesta de la velocidad de germinación de semillas de *Plukenetia volubilis* a tratamientos de escarificación y temperatura alternada

Tratamiento	Temperatura	Velocidad de germinación	Desviación Estándar	Coefficiente de Variación (%)	Mínimo	Máximo
Escarificación/ Imbibición	20/30°C	0.037500	0.002440	6.51	0.03546	0.04032
	25/30°C	0.034248	0.001685	4.92	0.03268	0.03663
Escarificación/ Sin Imbibición	20/30°C	0.039020	0.003130	8.02	0.03546	0.04274
	25/30°C	0.033336	0.001465	4.39	0.03158	0.03460
Sin Escarificación/ Sin Imbibición	20/30°C	0.037930	0.004830	12.73	0.03195	0.04219
	25/30°C	0.031346	0.000969	3.09	0.03030	0.03236

Por otra parte, los datos de la velocidad de germinación tuvieron distribución normal y presentaron un comportamiento diferente entre temperaturas, en la temperatura 20/30 °C fue mayor la velocidad de germinación, pero sin diferencias significativas (p-valor = 0,467) entre tratamientos y sin interacción entre los tratamientos y las temperaturas alternadas (Figura 3A, 3B).

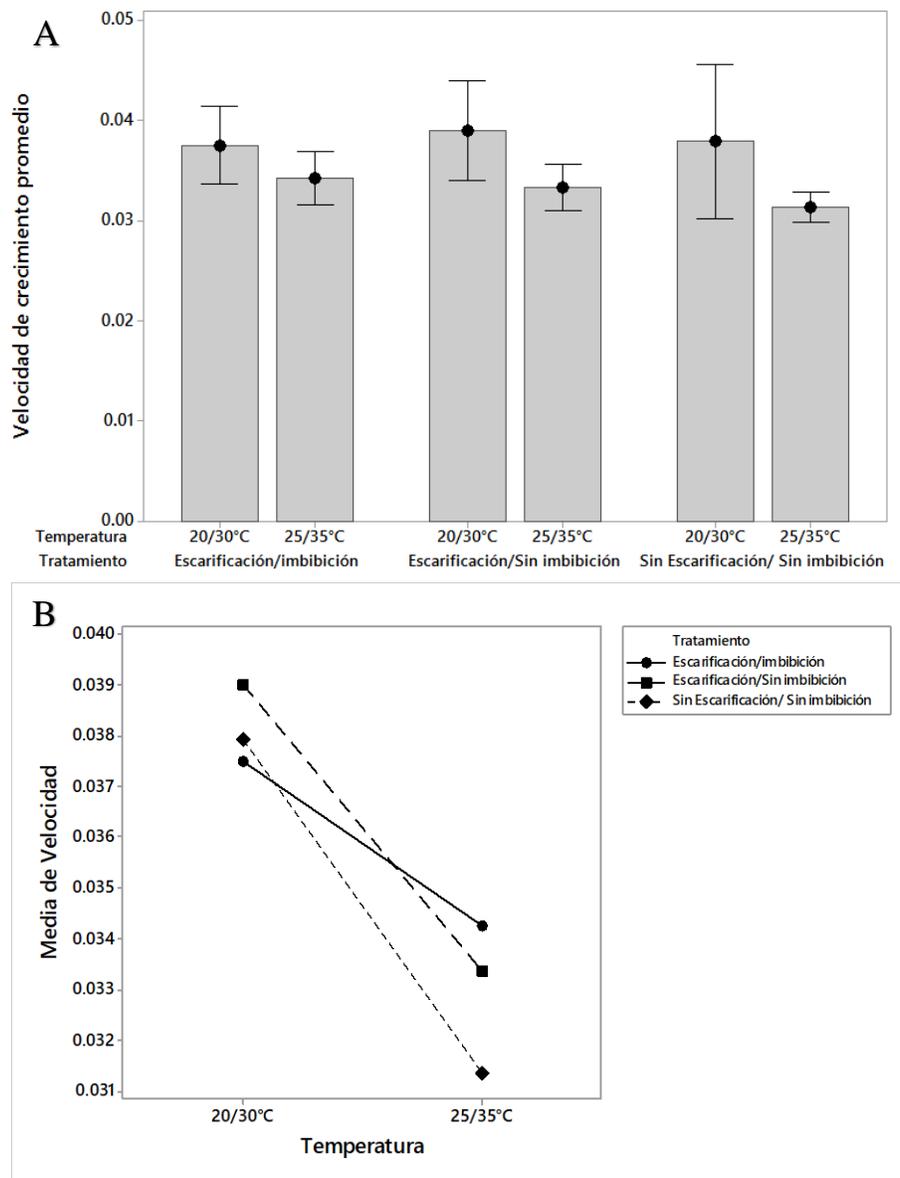


Figura 3. Respuesta de la velocidad de germinación de semillas de *Plukenetia volubilis* a tratamientos de escarificación y temperatura alternada (A), Figura de Interacción entre tratamientos y temperatura (B), Las barras verticales muestran la desviación estándar.

Durante el tiempo en que las semillas se encontraban en las pruebas de germinación se observó la presencia de microorganismos que podría ser un obstáculo en la germinación (figura 4), además se observó la presencia de antocianinas en algunos de los tratamientos de calidades de luz (figura5).

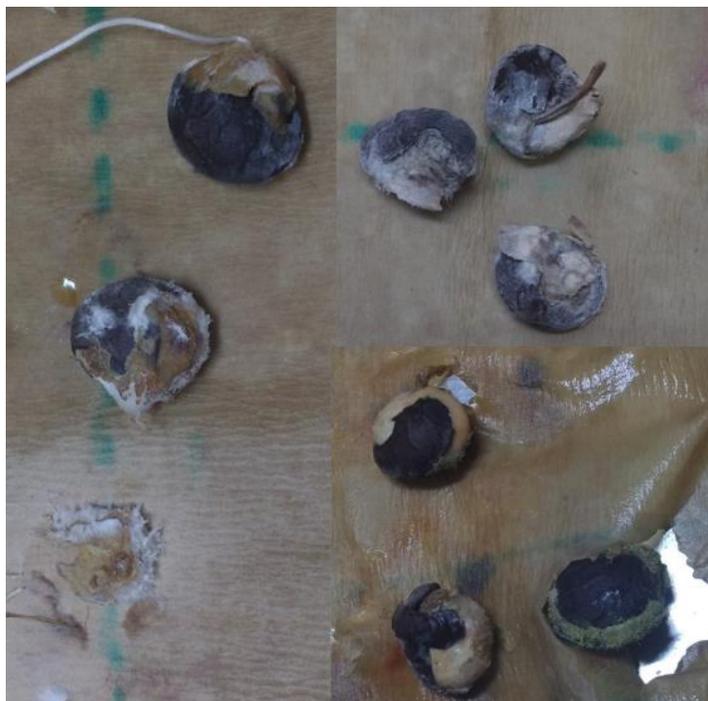


Figura 4. Microorganismos observados en las semillas de *Plukenetia volubilis* durante las pruebas de germinación.



Figura 5. Presencia de Antocianinas en las semillas de *Plukenetia volubilis* tratadas con luz Roja Lejana después del contacto con la luz y semillas tratadas con luz Roja.

4.5.2. Efecto de la calidad de la luz y la temperatura en la germinación. El porcentaje de germinación en todos los tratamientos con luz y temperaturas 20/30 °C (Figura 6A, 6B) alternadas estuvo entre el 60% y el 80%. En el tratamiento de oscuridad, la germinación fue más baja (45%). A pesar de esto, los resultados del modelo ajustado, no muestran evidencia de un efecto significativo en la interacción entre la temperatura y el tipo de luz (Valor $p=0,464$). Los datos presentaron distribución normal. No se encontraron diferencias significativas por lo que no fue necesario realizar el análisis post-ANOVA de Tukey.

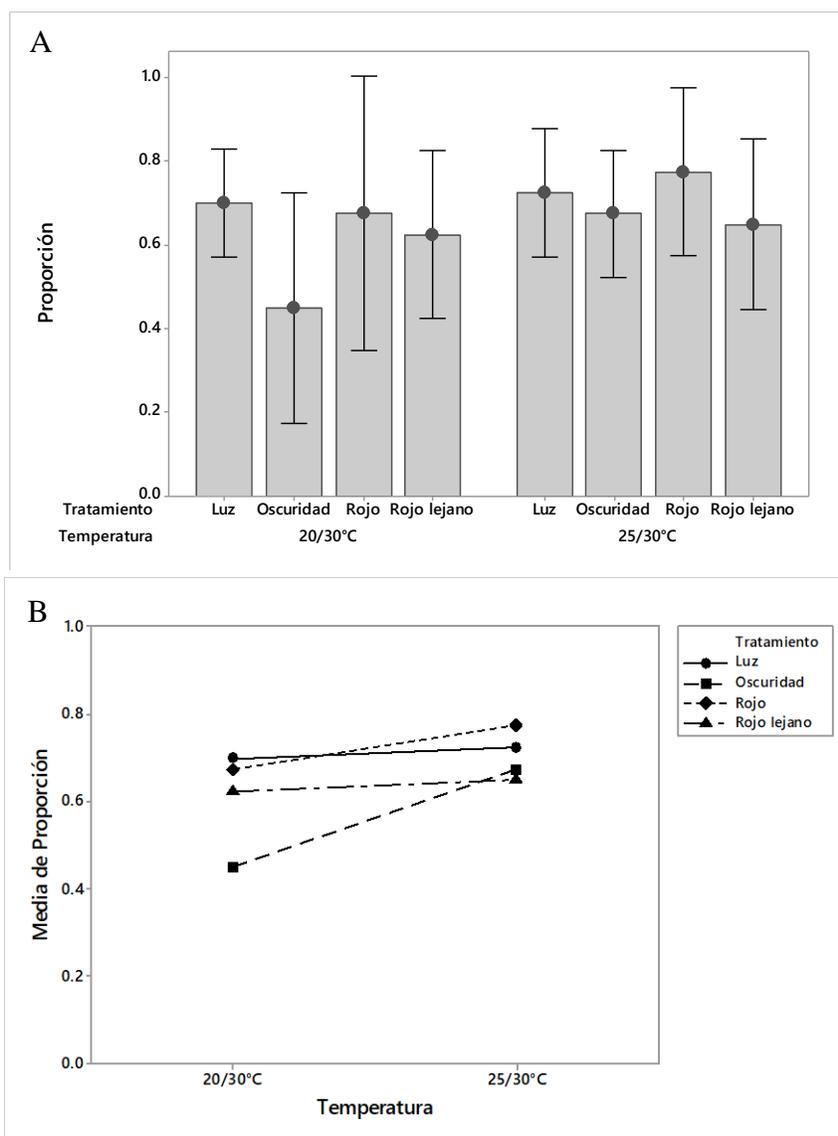


Figura 6. Respuesta de la germinación de semillas de *Plukenetia volubilis* a tratamientos de luz y temperatura alternada (A) Interacción entre tratamientos y temperatura (B). Las barras verticales muestran la desviación estándar (1=100%).

4.5.3. Comportamiento de las semillas en el almacenamiento. El porcentaje de semillas germinadas no varió de forma significativa en ninguno de las condiciones de almacenamiento. El análisis de varianza no se pudo llevar a cabo ya que al ser la mayoría de las proporciones iguales al 100%, no permitió el cumplimiento del supuesto de normalidad (Figura 7).

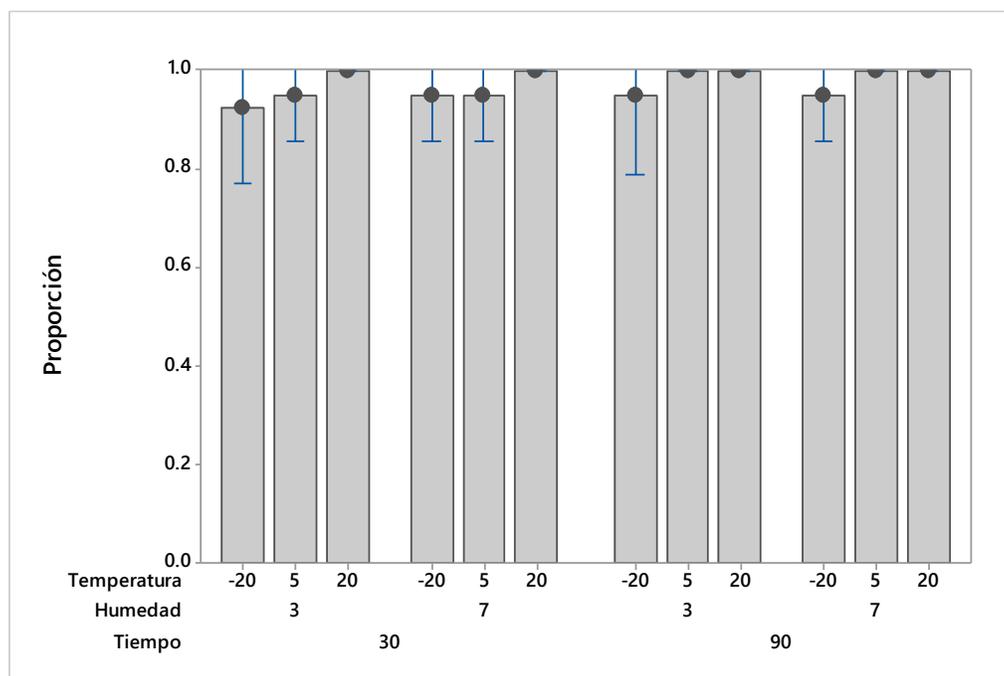


Figura 7. Comportamiento de las semillas de *Plukenetia volubilis* en diferentes condiciones de almacenamiento (1=100%).

4.6. DISCUSIÓN

4.6.1. Rompimiento de latencia

Los datos obtenidos mostraron porcentajes de germinación de 100%. La germinación de semillas es una etapa crítica en los ciclos de vida de las plantas, especialmente en el establecimiento y el éxito de las especies, la germinación es afectada en muchos casos por la latencia, sin embargo, las semillas de *Plukenetia volubilis* germinaron con altos porcentajes independientemente del tratamiento al cual fueron sometidas, por lo que se puede decir que no hay barreras de latencia y por ende pudieron germinar. Jones *et al.* 2016, y Miranda *et al.*, 2011, afirman que la escarificación permite romper la latencia física de las semillas, sin embargo, en el presente estudio las semillas que no se escarificaron

también presentaron porcentajes de germinación del 100%. Al parecer las pocas semillas que no germinaron fue debido a la presencia de microorganismos como hongos y bacterias (Figura 4), resultado también encontrado por Vázquez *et al.* 2000. En el presente trabajo se encontró el hongo 1 (H1-*Aspergillus sp.*) asociado a las semillas que no germinaron, lo cual pudo impedir la eclosión de la radícula. Existe una relación entre los microorganismos y las semillas que puede ser benéfico o dañino, (Chee-Sanford, J. y Fu. X 2010), en el presente estudio los hongos y las bacterias en las semillas pudieron frenar el proceso de germinación inicial (Figura 4) (Dalling 2002).

En cuanto a la velocidad de germinación se encontró que no varió significativamente entre tratamientos de escarificación o imbibición, pero si fue ligeramente menor en la temperatura 25/35 °C con relación a la menor temperatura (20/30°C); aunque no se descartan otros factores como el grado de desarrollo del embrión o el estado del embrión al momento del proceso de germinación sobre la velocidad de germinación (Arteaga 2007).

4.6.2. Efecto de la calidad de la luz y la temperatura en la germinación. Se observó que no hay interacción entre los factores de calidad de luz y temperatura, aunque a temperatura más baja 20/30 °C y en total oscuridad, se presentó una disminución considerable en el porcentaje de germinación (menor a 50%). Estos resultados coinciden con Ávila *et al.* (2015), donde la germinación de Sacha inchi es estimulada por la presencia de luz y temperaturas entre 25 y 35 °C. La supervivencia y el crecimiento inicial de las plántulas son favorecidos por la luz continua y la temperatura de 20/30 °C. Estas condiciones permiten una germinación rápida y uniforme de semillas y un mejor establecimiento y desarrollo de plántulas. Vargas *et al.* (2015) corroboró que el efecto de la temperatura y de las calidades de luz afecta a algunas especies vegetales, siendo la temperatura y la ausencia total de la luz los factores más limitantes en la germinación. Además, Escobar y Torres (2013) para *Alibertia patinoi* encontraron que la germinación fue más alta en condiciones de luz y temperatura específicas al hábitat de esta especie, lo cual concuerda con lo observado. Los datos encontrados en los tratamientos de calidades de luz a temperatura 25/30°C presentaron porcentajes superiores de germinación, comparados con los tratamientos con temperatura 20/30°C, lo cual concuerda con lo expuesto por Manco

(2006) donde las semillas de *P. volubilis* crecieron y tiene buen comportamiento a diversas temperaturas que caracterizan a la Amazonía (mín. 10°C y máx. 36°C), coincide con lo observado en el presente trabajo de investigación.

En el tratamiento de calidad de Luz con exposición a Luz Rojo, y Rojo Lejano, y posterior contacto con la luz, el día que se interrumpió la prueba, se observó presencia de las antocianinas (Figura 5). Las antocianinas podrían tener una acción de protección a los aceites poliinsaturados que presentan las semillas de *P. volubilis*, uno de los motivos de su importancia económica, y a su vez, pudo ser un factor que permitió el aumento en los porcentajes de germinación en los tratamientos que se observaron las antocianinas, Rojo (R) y Rojo Lejano (RL), como se observó en la figura 6. Estas antocianinas encontradas son un grupo de pigmentos de color rojo/violeta, hidrosolubles, ampliamente distribuidos en el reino vegetal, son interesantes por dos razones. La primera razón, es que las antocianinas tienen impacto sobre las características sensoriales de los alimentos, las cuales le dan un atractivo visual a los alimentos con fines comerciales, y la segunda, por su implicación en la salud humana a través de diferentes vías (Aguilera *et al*, 2011). Diversos estudios presentan evidencia científica que los extractos ricos en antocianinas pueden mejorar la agudeza visual, mostrar actividad antioxidante, atrapar radicales y actuar como agentes quimioprotectores. Las antocianinas también juegan un papel en las propiedades antidiabéticas tales como control de lípidos, secreción de insulina y efectos vaso protectivos (Garzón, 2008, Shipp y Abdel-Aal, 2010, Aguilera *et al*, 2011), esto puede aumentar la importancia económica de *P. volubilis*.

Mancinelli y Schwartz (1984) en las plántulas de tomate describe que la producción de antocianinas se debe a la fotosensibilidad, donde la cantidad de antocianinas estará determinada por la duración de los tratamientos de luz, probablemente reflejan una interacción entre los cambios en la capacidad de respuesta del sistema biológico a la acción de los fotorreceptores y los cambios en el estado operativo de los pigmentos fotomorfológicos. En el presente estudio se pudo activar el fitocromo, que participa en la fotorregulación de la producción de antocianinas, en el momento del choque de luz roja (inicial), las cuales obtuvieron porcentajes de germinación similares e incluso superior en

tratamiento de luz Rojo en 25/30°C, a los encontrados en las semillas expuestas a luz blanca y de luz directa en el momento de levantar el montaje (semillas tratadas con luz rojo lejano). Datos de otros sistemas sugieren que una sensibilidad espectral con alto espectro de rojo y azul, pero bajo o nulo de rojo lejano podría ser una característica común de la producción de antocianinas en sistemas con un bajo contenido de fitocromo (Mancinelli y Rabino, 1984), que en la presente investigación al parecer pudo beneficiar la germinación de las semillas. De acuerdo a un estudio realizado por Zapata *et al* (2015) que evaluó el efecto de antioxidantes (taninos, fenoles y antocianinas) presentes en la suspensión de mortiño (*Vaccinium meridionale* Sw), y encontró gran cantidad de antioxidantes naturales. Se observó que en el presente estudio en las semillas de *P. volubilis* se podrían encontrar antioxidantes de aceites poli insaturados por el efecto a la exposición de luz Rojo que podría prevenir la oxidación del aceite de Sacha inchi y mejorar su germinación. Según los datos obtenidos se podría realizar la activación del fitocromo y a su vez de las antocianinas con choque de luz Rojo a las semillas, lo cual podría estimular la germinación y beneficiar la conservación de los aceites poli insaturados presentes en estas, además se recomendaría tener los cultivos a luz directa para beneficiar además optimizar la germinación y el desarrollo de las plantas.

4.6.3. Comportamiento de las semillas en el almacenamiento. La germinación en las pruebas de conservación fue superior al 80% aun en una temperatura de -20 °C. Esto muestra que las semillas de Sacha inchi son ortodoxas, además que pueden ser conservadas por un periodo de tiempo de tres meses, sin que presenten daño que impida su germinación. El comportamiento ortodoxo en el almacenamiento se ha registrado en varias especies que presenta testa dura, de acuerdo con Thompson (2000), se puede predecir que estas semillas, tienen una longevidad alta, tanto en condiciones *ex situ*, como en condiciones *in situ* de bancos de semillas.

Según Murdoch y Ellis (2000), el almacenamiento de semillas con una alta deshidratación, incrementa el período medio de viabilidad. En el presente estudio se observó en que el porcentaje de germinación en algunas semillas después de tres meses de almacenamiento se incrementó, comparadas con las semillas almacenadas durante un mes en condiciones de

humedad similares (3% y 7%). Esta respuesta sugiere que las semillas de Sacha Inchi podrían persistir en bancos de semillas, como lo hacen exitosamente en condiciones *in situ*.

4.7. LITERATURA CITADA

AGUILERA, M., REZA, M. C., CHEW, R. G. & MEZA, J. A. 2011. Propiedades funcionales de las antocianinas. *BIOtecnia* 13(2):16-22.

ARTEAGA, L. 2007. El tamaño de las semillas de *Vismia glaziovii* Ruhl. (Guttiferae) y su relación con la velocidad de germinación y tamaño de la plántula. *Rev. Peru. biol.* 14(1):017- 020.

ÁVILA, A., DE MAGALHÃES, A., DES DE LIMA, E., DA SILVA, C. & SILVA, H. 2015. Environmental factors on seed germination, seedling survival and initial growth of sachá inchi (*Plukenetia volubilis* L.), *Journal of Seed Science* 37 (2):111-116.

BENVENUTI, S., MACCHIA, M. & MIELE, S. 2001. Light, temperature and burial depth effects on *Rumex obtusifolius* seed germination and emergence. *Weed Research* 41:177-186.

CAI, Z.Q. 2011. Shade delayed flowering and decreased photosynthesis, growth and yield of Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis*) plants. *Industrial Crops and Products* 34:1235-1237.

CARVALHO, L., RENATA DE, SILVA, R.D., APARECIDO, E., DA, A. & DAVIDE, A. C. 2006. Classificação de sementes florestais quanto ao comportamento no armazenamento. *Revista Brasileira de Sementes*, 28(2):15-25.

CHEE-SANFORD, J. & FU, X. 2010. Investigating the role of microorganisms in soil seed bank management. Pages 257–266 en A. Mendez-Vilas, ed. *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*. Badajoz, Spain: Formatex Research.

CHIRINOS, R., ZULOETA, G., PEDRESCHI, R., MIGNOLET, E., LARONDELLE, Y. & CAMPOS, D. 2013. Sacha inchi (*Plukenetia volubilis*): A seed source of polyunsaturated

fatty acids, tocopherols, phytosterols, phenolic compounds and antioxidant capacity. Food Chemistry 141:1732-1739.

DALLING, D.M. 2002. Ecología de semillas. En: Guariguata M, Kattan G (eds.). Ecología y conservación de bosques neotropicales. Libro universitario Regional. Cartago, Costa Rica. Pp 345-375.

ESCOBAR, D. F. & TORRES, A. M. 2013. Morphology, ecophysiology and germination of seeds of the neotropical tree *Alibertia patinoi* (Rubiaceae). Revista de Biología Tropical, 61(2):547-556.

FANALI, C., DUGO, L., CACCIOLA, F., BECCARIA, M., GRASSO, S. & DACHÀ, M. 2011. Chemical characterisation of Sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.) oil. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 59(4):13043-13049.

FENNER, M. & THOMPSON, K. 2005. The ecology of seeds. New York: Cambridge University Press. Pp 250.

FU, Q., NIU, L., ZHANG, Q., PAN, B-Z., HE, H. & XU, Z.F. 2015. Benzyladenine treatment promotes floral feminization and fruiting in a promising oilseed crop *Plukenetia volubilis*. Industrial Crops and Products 59:295-298.

GARMENDIA, F., PANDO, R. & RONCEROS, G. 2011. Efecto del aceite de Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis* L) sobre el perfil lipídico en pacientes con hiperlipoproteinemia. Rev Peru Med Exp Salud Pública 28(4):628-32.

GARZÓN, G. A. 2008. Las antocianinas como colorantes naturales y compuestos bioactivos: Revisión. Acta biol. Colomb. 13(39):27-36.

GOMEZ, E., ALVAREZ, A. & LLANO, E. 2005. Identificación y caracterización de cepas de *Ralstonia solanacearum* raza 2, agente causante del Moko de plátano en Colombia. Fitopatología Colombiana 28 (2):71-75.

GONZALEZ, G., BELKHELFA, H., HADDIOUI-HBABI, L., BOURDY, G. & DEHARO, E. 2015. Sacha Inchi Oil (*Plukenetia volubilis* L.), effect on adherence of *Staphylococcus*

aureus to human skin explant and keratinocytes in vitro. Journal of Ethnopharmacology 171:330-334.

GUTIÉRREZ, L.F., ROSADA, L.M. & JIMÉNEZ, A. 2011. Chemical composition of Sacha inchi (*Plukenetia volúbilis* L.) seeds and characterisation of their lipid fraction. Grasas y aceites 62:76-83.

HONG, T. D. & ELLIS, R. H. 1996. A protocol to determine seed storage behaviour. (Technical Bulletin No. 1) Retrieved from International Plant Genetic Resource Institute <http://www.cbd.int/doc/case-studies/ttcc/SeedStorage.pdf>. Pp 62.

INTERNATIONAL RULES FOR SEED TESTING ASSOCIATION. 1999. Seed Science and Technology RULES, 27 Supplement.

JIMÉNEZ, R.L.; MARTÍNEZ, G.M. & CRUZ, D.R. 2000. El género *Plukenetia* (Euphorbiaceae) en México. Anales del Instituto de Biología Universidad Nacional Autónoma de México, Serie Botánica 71(1):11-18.

JONES, C., STEVENS, M., JOLLEY, V., HOPKINS, B., JENSEN, S., TURNER, D. & STETTLER, J. 2016. Evaluation of thermal, chemical, and mechanical seed scarification methods for 4 Great Basin lupine species. Native Plants Journal 17(1):5-17.

KENDRICK, R. E. & SPRUIT, C. J. P. 1977. Phototransformation of phytochrome. Photochemistry and Photobiology 26:201-214.

LAGARDA, M. J., GARCÍA-LLATAS, G. & FARRÉ, R. 2006. Analysis of phytosterols in foods. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 41:1486-1496.

MANCO, E. 2006. Situación y avances del cultivo de sachá inchi en el Perú. Subdirección de Recursos Genéticos y Biotecnología Estación Experimental Agraria “El Porvenir” – Tarapoto, Perú. Pp 11.

- MANCINELLI, A. L. & SCHWARTZ, O.M. 1984. The Photoregulation of Anthocyanin Synthesis IX. The Photosensitivity of the Response in Dark and Light-Grown Tomato Seedlings. *Plant Cell Physiol.* 25 (1): 93-105.
- MCCULLOUGH, J. M. & SHROPSHIRE, W. J. 1970. Physiological predetermination of germination responses in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant & Cell Physiology* 11:139-148.
- MIRANDA, R., OLIVEIRA, M., CORREIA, R., ALAMEIDA, J. & POMPELLI, M. 2011. Germination of *Prosopis juliflora* (Sw) DC seeds after scarification treatments. *Plant Species Biology* 26 (2):186-192.
- MURDOCH, A.J. & ELLIS, R.H. 2000. "Dormancy, Viability and Longevity". In Fenner, M. *Seeds: The Ecology of Regeneration in Plant Communities*. CABI, New York, NY, pp 183-206.
- OSPINA, J.; GUEVARA, C. & SÁNCHEZ, M. 2000. Latencia en semillas de Manihot Y Ricinus (Euphorbiaceae). *Acta Agronómica* 50 (3-4):30-37.
- PEREZ L. A. 2014. Evaluación de la adaptación de *Plukenetia volubilis* L. (SACHA INCHI), bajo condiciones orgánicas en el Sinú medio, departamento de Córdoba (Colombia). Tesis de pregrado. Universidad de Córdoba, Montería, Colombia. Pp 71.
- POSADA, P., OCAMPO, J. & SANTOS, L. 2014. Estudio del comportamiento fisiológico de la semilla de tres especies cultivadas de *Passiflora* L. (Passifloraceae) como una contribución para la conservación *ex situ*. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 8(1):9-19.
- RANAL, M. A. & SANTANA, D. G. 2006. How and why to measure the germination process? *Revista Brasileira de Botânica* 29(1):1-11.
- RAO, N.K., HANSON, J., DULLO, M.E., GHOSH, K., NOVELL, D. & LARINDE, M. 2007. Manual para el manejo de semillas en bancos de germoplasma. Manuales para el manejo de bancos de germoplasma No.8. Bioversity International, Roma. Pp 182.

- SHIPP, J. & ABDEL-AAL S. M. 2010. Food Applications and Physiological Effects of Anthocyanins as Functional Food Ingredients. *The Open Food Science Journal*, 4:7-22.
- TASSO, H.M.O., LA SERNA, H.V.M., PICCARDO, R.L.J., VENTURA, M.A.J., CÓRDOVA, S.R. & CASTILLO, S.A.M. 2013. Boletín técnico, cultivo de sachá inchi (*Plukenetia volubilis* L.). Ministerio de Agricultura de Competitividad Agraria. Lima, Perú. Pp 59.
- THOMPSON, K. 2000. The functional ecology of soil seed banks. *Seeds: the Ecology of Regeneration in Plant Communities*, 2:215-235. *CAB International, Oxford*.
- VARELA, S. & ARANA, V. 2011. Latencia y germinación de semillas. Tratamientos pregerminativos. Consultada y obtenida junio 2017 en: http://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-inta_latencia.pdf
- VARGAS, J. A., DUQUE, O. L. & TORRES, A. M. 2015. Germinación de semillas de cuatro especies arbóreas del bosque seco tropical del Valle del Cauca, Colombia. *Rev. Biol. Trop.* 63 (1):249-261.
- VAZQUEZ, P., HOLGUIN, G., PUENTE, M., CORTES, A.E., & BASHAM, Y. 2000. Phosphate solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of mangroves in a semi-arid coastal lagoon. *Biol Fert Soils*, 30: 460-468.
- ZAPATA, K., PIEDRAHITA, A., ALZATE, A., CORTÉS, F. & ROJANO, B. 2015. Estabilización oxidativa del aceite de Sachá inchi (*Plukenetia volubilis* Linneo) con suspensiones de mortiño (*Vaccinium meridionale* SW). *Ciencia En Desarrollo* 6(2):141-153.
- ZULETA, E.C., RIOS, L.A. & BENJUMEA, P.N. 2012. Oxidative stability and cold flow behavior of palm, Sachá-inchi, *Jatropha* and castor oil biodiesel blends. *Fuel Process. Technol.* 102:96-101.

5. CAPITULO 2: CARACTERIZACIÓN SANITARIA DE LAS SEMILLAS DE *P. volubilis*

5.1. RESUMEN

Dado el potencial económico de *Plukenetia volubilis* es primordial el análisis fitosanitario, que permita determinar la proporción de microorganismos asociados a las semillas que puedan afectar el cultivo. Los microorganismos pueden ser transportados adheridos a la superficie de la semilla, en su interior o como parte del material inerte. Con el propósito de determinar la presencia de posibles microorganismos patógenos asociados a las semillas de *P. volubilis* se realizaron pruebas de infección con microorganismos aislados de las mismas semillas con base en los postulados de Koch. Se evaluó la sanidad de la semilla y la posible patogenicidad de los microorganismos encontrados en las semillas, utilizando los postulados de Koch. Se encontraron 24 cepas diferentes de hongos y 29 cepas bacterianas, dentro de las cuales se corroboró como hongos patógenos especímenes de los géneros *Fusarium sp.*, *Aspergillus sp.*, *Lasiodiplodia sp.*, *Curvularia sp.*, *Colletotrichum sp.* e *Hypoxylon sp.* En cuanto a las bacterias se reportaron los géneros *Bacillus sp.* y *Paenibacillus sp.* como patógenos de las semillas con posible efecto sobre el cultivo.

5.2. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades de las plantas son un factor determinante y de gran importancia en los cultivos con un promisorio valor económico. Estas enfermedades pueden estar causadas por agentes bióticos principalmente hongos y bacterias, con menor proporción de virus, fitoplasmas, nemátodos, insectos entre otros, o agentes abióticos, que alteran el normal funcionamiento de las plantas y pueden resultar en enfermedades (Jacas *et al.* 2005).

En los bosques tropicales cerca de la mitad de semillas producidas por el 90% de las especies de árboles mueren antes de germinar por problemas que generan diferentes patógenos (Janzen y Vasquez-Yanes, 1991 y Dalling, 2002). La obtención y manejo de semillas sanas es muy importante ya que es una de las medidas de control de las enfermedades, debido a que las semillas son uno de los principales vehículos transportadores de patógenos (Pacheco, 1989), por consiguiente, se debe evaluar la calidad

de las semillas mediante pruebas sanitarias con el fin de caracterizar estos agentes patógenos y posteriormente lograr condiciones fitosanitarias adecuadas en los cultivos.

No se encuentran muchos registros de caracterizaciones fitopatológicas para *Plukenetia volubilis*, excepción del estudio realizado por Vecco *et al.* (2015) donde se menciona al insecto *Pseudophilothrips* sp. (fitófago) como el causante de serios problemas fitosanitarios. En estudios realizados en Perú, se ha encontrado una alta susceptibilidad a *Meloidogyne spp.*, “nematodo del nudo de la raíz”, principal problema fitosanitario, que ocasiona elevada mortandad de plantas, al segundo año de producción. Asimismo, se reportan daños considerables por *Fusarium spp.* en estado de plántula y en plantas adultas asociados a daños por *Meloidogyne spp.* (Manco 2006). Por el contrario, en la yuca (*Manihot spp.*), especie de la misma familia de *P. volubilis* si se han estudiado ampliamente los patógenos. Dentro de las principales enfermedades fúngicas para la yuca figuran las manchas foliares causadas por especies de *Cercosporidium henningsii* o por *Phaeoramularia manihotis*, otros hongos fitopatógenos son: *Cercosporidium sp.*, *Cercospora sp.*, *Phaeromularia sp.*, *Phoma sp.*, *Oidium spp.*, *Phytophthora sp.* y *Colletotrichum sp.*, estos dos últimos se presentan por lo general, en la etapa poscosecha, dado su efecto directo en la raíz. Las bacterias *Xanthomonas sp.*, *Agrobacterium sp.*, y *Erwinia sp.*, pueden provocar también pudriciones en la yuca. Las enfermedades virales son básicamente el mosaico común de la yuca y el mosaico de las nervaduras de la yuca (Fonseca y Saborío 2001, Vásquez y López 2012).

5.3. OBJETIVOS

5.3.1. OBJETIVO GENERAL

Determinar los microorganismos patógenos asociados a la semilla de *Plukenetia volubilis*.

5.3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Estimar la posible patogenicidad de los microorganismos aislados en las semillas de *P. volubilis*
2. Identificar morfológica y molecularmente los microorganismos patógenos en semillas de *P. volubilis*.

5.4. MÉTODOS

5.4.1. Material vegetal. Se utilizaron semillas de *P. volubilis* recolectadas en la Finca Samanuran (Los Samanes de Urantia), ubicada a una altura de 987 m.s.n.m., municipio de Cali, Valle del Cauca (3°21'10.3" N - 76°30'36.8" W).

5.4.2. Sanidad de las semillas. El trabajo de pruebas fitosanitarias se realizó en la Estación Experimental y en el Laboratorio de Investigaciones microbiológicas (LIM) del Departamento de Biología, en el campus de la Universidad del Valle-sede Meléndez, Cali, Colombia (3°22 N - 76°31 W), entre 970 y 990 m.s.n.m.

Para la prueba sanitaria se trabajó siguiendo las reglas ISTA (International Rules for seed Testing Association, 1999), en un diseño factorial de 2x2 para un total de 4 tratamientos: (1) Semillas sin escarificación y con escarificación (SE/CE). (2) Semillas con desinfección y sin desinfección (SD/CD); se tomaron un total de 800 semillas (200 por tratamiento) repartidas en 4 repeticiones de 10 cajas por repetición y 5 semillas por caja (Tabla 4). Las semillas se colocaron en la superficie de cajas de Petri con agar PDA (Agar-Papa-Dextrosa) y se incubaron a 28°C, durante 6 a 10 días., con el propósito de permitir el crecimiento de los microorganismos presentes en cada uno de los tratamientos realizados.

Tabla 4. Tratamientos de las semillas para la prueba de sanidad.

FACTORES	NIVELES
ESCARIFICACIÓN	SIN
	CON
DESINFECCIÓN	SIN
	CON

5.4.3. Aislamiento de los microorganismos presentes en la semilla y posibles patógenos. Los microorganismos a evaluar como posibles patógenos se aislaron a partir de las muestras de un lote en almacenamiento de las semillas de *P. volubilis*. El aislamiento de las bacterias se realizó en agar nutritivo y el de los hongos en PDA.

5.4.4. Tratamiento de las muestras. Se tomaron las semillas de *P. volubilis*, se lavaron con agua destilada estéril durante 30 min., posteriormente se escarificaron (sin testa), escarificación mecánica y total y/o se desinfectaron (con desinfección), para estos tratamientos las semillas se sumergieron en alcohol al 70% por 30 segundos para romper tensión superficial e hipoclorito de sodio al 3% durante 1 minuto, luego se enjuagaron 3 veces con agua destilada estéril por 1 minuto, se secaron en papel absorbente estéril, posteriormente se sembraron en el medio de cultivo PDA, se llevaron a la incubadora a una temperatura de 28°C, durante 5 a 7 días (Gómez, 2005). Posteriormente se tomó una muestra de cada microorganismo encontrado en las semillas para aislarlo y purificarlo. Para los hongos se extrajo un trozo o bocado del medio con presencia del microorganismo y se pasó a una caja con medio de cultivo estéril PDA para su aislamiento, este proceso se repitió por cada una de las 24 cepas de hongo que se observaron. Para las bacterias se realizaron siembras en agar nutritivo, siembra por estría de cada una de las 29 cepas de bacterias encontradas hasta lograr su aislamiento y purificación, que se comprobó por observación de colonias en estado puro y coloración Gram.

Una vez purificados los hongos se realizaron cultivos monospóricos con el objeto de garantizar pureza del microorganismo. De todos los microorganismos se realizaron descripciones de su morfología tanto macro como microscópicas, para los hongos se observó su textura, forma de crecimiento en caso de presentar esporas, el color y la forma de estas, las hifas con/sin septos, estructuras reproductivas, además, se utilizaron claves para la determinación de los hongos confirmando esta descripción con las secuencias moleculares.

Por otro lado, a las colonias de bacterias se les observó el crecimiento, la forma, la elevación, el margen, la coloración, a nivel microscópico la forma, el tamaño y la coloración Gram que presento. Se tomaron microfotografías de las placas de los hongos y bacterias fitopatógenas con el SOFTWARE NIS ELEMENTS Br, fotos tomadas con cámara digital Nikon Modelo DS-Ri1 U3, observadas en el microscopio Nikon Modelo Eclipse Ni-U 90 en el Laboratorio de imágenes del postgrado en Ciencias-Biología de la Universidad del Valle.

5.4.5. Pruebas de patogenicidad. Del lote inicial de semillas se pre-germinaron en incubadora 100 semillas, luego se transfirieron a un espacio al aire libre de la Estación de Biología. Cuando las plántulas cumplieron 3 a 4 meses y presentaban entre 25-30 cm de altura se llevaron al invernadero de fitopatología para obtener el vivero con plántulas de *P. volubilis*, que posteriormente se usaron para las pruebas de patogenicidad.

Bacterias: La preparación del inoculo fresco de cada cepa de bacteria se realizó reactivando cada cepa en caldo nutritivo durante la noche por 12 horas (overnight), luego se calculó la concentración en el espectrofotómetro, densidad óptica a 600nm, hasta obtener una densidad celular de $OD_{600} = 0.5$, posteriormente cada muestra se concentró por centrifugación, el precipitado fue luego resuspendido en agua destilada estéril. Antes de la inoculación se prepararon las plantas, humedeciéndolas y dejándolas por 12-16 horas con bolsas plásticas, generando así un microclima. Se realizó la inoculación con jeringas estériles en 4 plantas adultas (de manera aleatoria) por cada cepa bacteriana, generando heridas en tallo, hojas e inyectando inoculo en el suelo donde estaban sembradas las plantas.

Los síntomas se evaluaron cada día de por medio durante 18 días, teniendo en cuenta si las plantas estaban o no afectadas por el microorganismo (en el borde de la herida) y la intensidad en que el microorganismo afecto a la plántula, siguiendo protocolos descritos previamente por Gómez (2005). Al finalizar la prueba se evaluó si las plántulas inoculadas presentaban síntomas de enfermedad, si eran afectadas, se tomaba una muestra del tejido enfermo, luego se cortada en porciones, que se desinfectaron con alcohol al 70% por 30 segundos e hipoclorito de sodio al 3% durante 1 minuto, luego se enjuagaron 3 veces con agua destilada estéril por 1 minuto, se secaron en papel absorbente estéril, se realizó un macerado de las zonas afectadas del tejido vegetal en agua destilada estéril y sembraron en cajas de Petri con agar nutritivo, 2 cajas (repeticiones) por bacteria inoculada, después se confirmó que las bacterias re-aisladas estuvieran presentes en el cultivo bacteriano inicial.

Hongos: La preparación del inoculo fresco de cada cepa de hongo se realizó reactivando la cepa microbiana en PDA, luego se calculó la concentración de esporas, aproximadamente

1×10^7 a 1×10^8 esporas/ml, utilizando el hematocitometro y después se disolvió en agua destilada estéril.

La inoculación de los hongos y las pruebas de infección en campo, se realizaron de la misma manera como se describió para bacterias, con la diferencia que se tomaron 5 porciones de 1 cm de los tejidos afectados, y se sembraron en cajas de Petri con PDA.

5.4.6. Obtención de secuencias para identificación molecular de microorganismos.

Obtención de ADN genómico

Se realizó la extracción de ADN a los microorganismos (bacterias y hongos) aislados a partir de tejido vegetal enfermo y fueron sometidos a pruebas de identificación molecular (Denny y Hayward, 2001). Los microorganismos fueron cultivados en placas solidificadas con agar-agar utilizando medio LB, (Caldo Luria Bertani) y PDA para bacterias y hongos respectivamente. El kit comercial UltraClean® Soil DNA Isolation fue utilizado para obtener el ADN genómico, que fue posteriormente; El ADN fue cuantificado con un espectrofotómetro Nanodrop 2000.

Amplificación enzimática mediante PCR

Bacterias: Se realizó la amplificación del gen del ARNr 16S utilizando los cebadores 27F (5' AGAGTTTGATCMTGGCTCAG 3') y 1492R (5' TACGGYTACCTTGTTACGACTT 3'). El coctel utilizado en la amplificación del gen del ARNr 16 fue: Buffer (1X), MgCl₂ (1.75 mM), DNTP's (0.2 mM), cebadores (4 mM) y taq polimerasa (1 unidad). El perfil térmico se configuro de la siguiente manera: desnaturalización inicial a 95°C durante 5 minutos, seguido de 30 ciclos a 95°C durante 30 segundos, 54°C durante 45 segundos para la región 16S.

Hongos: Se realizó la amplificación de la región de ADN nuclear comprendida entre las sub unidades 18S y 28S, que corresponde al espaciador ITS1, la región 5.8S y el espaciador ITS4. El coctel de amplificación utilizado en la amplificación de las regiones ITS1 e ITS4 fue igual que en bacterias: Buffer (1X), MgCl₂ (1.75 mM), DNTP's (0.2 mM), cebadores

(4 mM) y taq polimerasa (1 unidad). El perfil térmico utilizado en el caso de la región ITS solo varió en la temperatura de hibridación, respecto al utilizado en bacterias, configurándose de la siguiente manera: desnaturalización inicial a 95°C durante 5 minutos, seguido de 30 ciclos a 95°C durante 30 segundos, la temperatura de hibridación fue de 52 °C, 72 °C en la fase de amplificación; seguido una fase de extensión final a 72°C por 10 minutos.

En los dos casos los productos amplificados se visualizaron en geles de agarosa al 1.4% con bromuro de etidio en un transiluminador ultravioleta. Los fragmentos obtenidos posteriormente fueron purificados y secuenciados por medio de un proveedor especializado en Macrogen, Corp. (USA).

Las regiones para la amplificación del ADN utilizadas en el presente estudio son comúnmente usadas como códigos de barras de ADN para la identificación biológica de especies de bacterias y hongos. (Bellemain *et al.* 2010; Lebonah *et al.* 2014).

5.4.7. Análisis de datos moleculares. Las secuencias se editaron empleando BioEdit (Hall 1999), y el alineamiento se realizó con el algoritmo MUSCLE en Mega 6 (Edgar 2004; Tamura *et al.* 2013).

Las secuencias únicas para establecer la identidad de los microorganismos aislados fueron comparadas con las disponibles en las bases de datos públicas del NCBI mediante la herramienta BLAST (Altschul *et al.* 1990). Se tuvieron en cuenta las coincidencias con un 100% de cobertura y más de 98% de similitud para asignar un género a cada aislado y las secuencias con una cobertura mayor a 98% y similitud mayor a 90% se incluyeron en el análisis de inferencia filogenética para establecer la identidad de la especie. Para estimar el modelo de sustitución nucleotídica que mejor se ajustara a los datos obtenidos, se empleó el criterio de inferencia de AKAIKE en el programa JModeltest (Darriba *et al.* 2012). El modelo seleccionado para las secuencias de la región 16S fue el Kimura (1980) con distribución Gamma K2+G y el seleccionado para los espaciadores internos ITS en hongos, fue el modelo de sustitución nucleotídica de Kimura (1980) con distribución Gamma y sitios invariables K2+G+I. Empleando los modelos seleccionados para cada región

específica, se reconstruyó un árbol para evidenciar las relaciones entre los aislamientos, por medio del método de máxima verosimilitud (ML) con un Broostap de 1.000 en el programa Mega 6 (Tamura *et al.* 2013).

5.4.8. Análisis estadístico. El análisis estadístico de los datos fitopatológicos se realizó mediante estadística descriptiva (histogramas, promedios y gráficas de distribución de frecuencias), después se validaron los supuestos de forma gráfica y una ANOVA factorial 2x2, se comprobó la significancia del supuesto de normalidad con la prueba Shapiro – Wilk y la significancia del supuesto de homocedasticidad se comprobó mediante la prueba de Bartlett, asumiendo en ambos casos una significancia del 5% se aplicó la prueba post – ANOVA de Tukey para evaluar las diferencias significativas detectadas con el Análisis de Varianza.

5.5. RESULTADOS

5.5.1. Tipos de microorganismos cultivables encontrados en los cuatro tratamientos.

De acuerdo a las características morfológicas macro y microscópicas de las colonias se aislaron 24 cepas de hongos y aproximadamente 29 cepas bacterianas diferentes cultivables, distribuidas en los diferentes tratamientos de las semillas. Algunos microorganismos estaban presentes en uno o más tratamientos (Tabla 5).

Tabla 5. Microorganismos presentes en las semillas de *P. volubilis* por tratamiento.

MICROORGANISMOS AISLADOS		Tratamiento 1	Tratamiento 2	Tratamiento 3	Tratamiento 4	
		SD/SE	SD/CE	CD/SE	CD/CE	
		Sin desinfección/Sin escarificación	Sin desinfección/Con escarificación	Con desinfección/Sin escarificación	Con desinfección/Con escarificación	
HONGOS	TOTAL	13	11	10	11	24
	PATOGENAS	3	4	3	7	8
	PROMEDIO POR UNIDAD EXPERIMENTAL	5,25	3,24	1,92	0,61	---
BACTERIAS	TOTAL	2	7	8	12	29
	PATOGENAS	0	2	0	3	4
	PROMEDIO POR UNIDAD EXPERIMENTAL	0,50	0,35	2,38	1,14	---

Se observó una variación en el número promedio de colonias de hongos aisladas, por unidad experimental (caja de Petri), el tratamiento 1 (SD/SE) presentó un promedio de 5,25 colonias, con una mayor diversidad y cantidad de hongos, en comparación con los demás tratamientos. En el tratamiento 2 (SD/CE), el promedio de colonias de hongos por unidad experimental disminuyó a 3,24; de igual manera, para el tratamiento 3 (CD/SE), la cantidad promedio de hongos disminuyó a 1,92 y finalmente, en el tratamiento 4 (CD/CE), se observó una cantidad promedio de hongos de 0,61, por caja de Petri, lo cual indica una reducción significativa en comparación con el tratamiento 1 (5,25) (Tabla 5).

El mayor número de hongos patógenos (7) se observó en el tratamiento (CD/CE), seguido del tratamiento (SD/CE) cuyas semillas no poseían testa, comportamiento que indica que estos microorganismos estaban en el interior de las semillas. Mientras que en los tratamientos (SD/SE, CD/SE), cuyas semillas poseían testa, el número de patógenos aislados fue menor, evidenciándose de esta manera que la testa actúa como barrera de protección para que los patógenos no ingresen al interior de semilla (Tabla 5).

Se observó muy poca variación en el número promedio de cepas de bacterias por unidad experimental (caja de Petri), encontrándose valores muy similares en el rango de 0,50 a 2,38 (Tabla 5).

Mientras que el número promedio de cepas bacterianas por tratamiento varió, encontrándose el menor número de colonias (2) en el tratamiento de las semillas con testa y que no fueron desinfectadas (SD/SE), aumentando a 7 y 8 en los tratamientos (SD/CE y (CD/SE) respectivamente, el mayor número de colonias (12) fue para el tratamiento (CD/CE). En este último tratamiento también se aisló el mayor número de cepas bacterianas patógenas (3), seguido del tratamiento (SD/CE), comportamiento similar al obtenido para los hongos, evidenciándose que los microorganismos patógenos se encontraron en mayor proporción en el interior de las semillas, pues en los tratamientos cuyas semillas conservaron la testa no se encontraron bacterias patógenas (Tabla 5).

El análisis estadístico para determinar la sanidad de las semillas, dada por la cantidad y tipo de microorganismos aislados en los diferentes tratamientos, se hizo únicamente para los

hongos obtenidos en cada una de las unidades experimentales (cajas de Petri), debido a que en bacterias la morfología macroscópica no garantiza diversidad de especies.

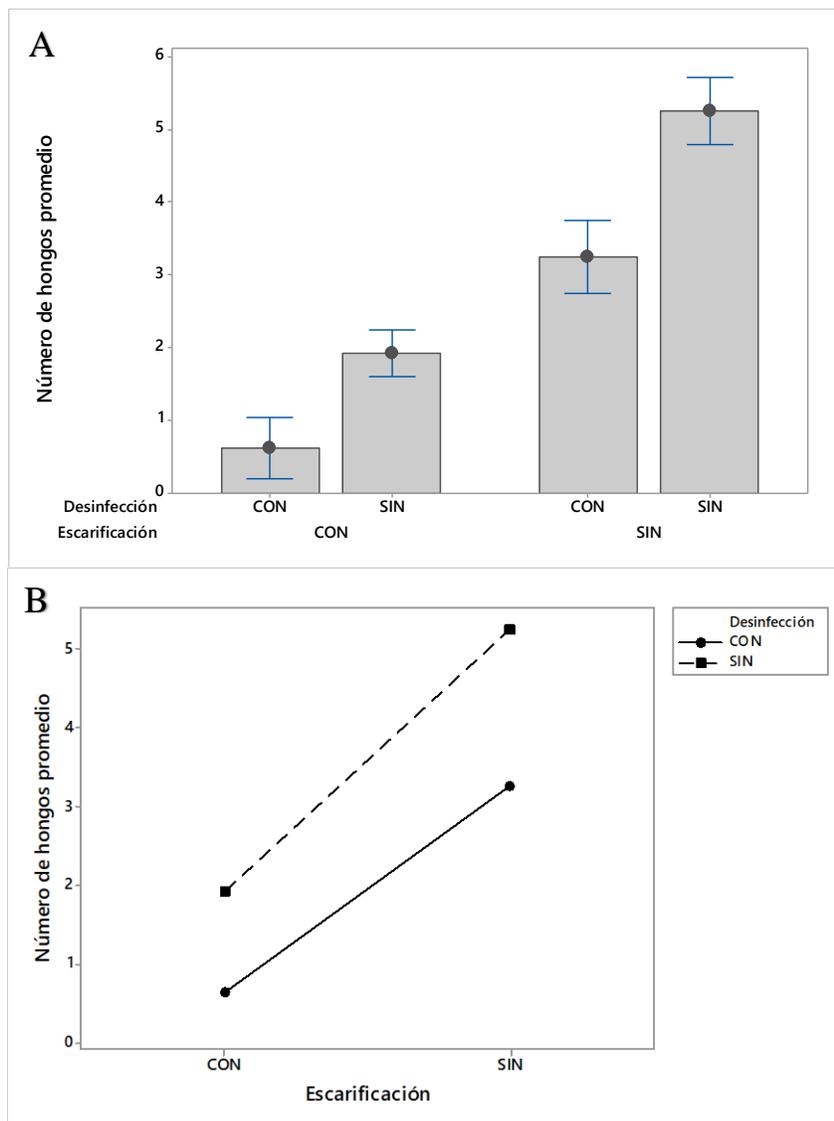


Figura 8. Diagrama de barras con intervalos del 95% de confianza (A) y diagrama de interacciones (B) para el número promedio de hongos en las semillas tomando en cuenta el proceso de escarificación y desinfección.

El análisis descriptivo que se muestra en la Figura 8, representa como la escarificación y la desinfección de las semillas permitió disminuir el número de hongos comparado con las semillas no escarificadas y no desinfectadas. La testa porta microorganismos que provienen del ambiente y que a su vez actúa como una barrera evitando que los microorganismos

externos penetren la semilla y que la escarificación mostró un número menor de microorganismos, pero propios de esta, los cuales pueden ser endófitos y estar realizando funciones simbióticas, además La desinfección también generó que la cantidad de microorganismos disminuyera en las semillas, siendo la combinación de los dos tratamientos la opción más acertada para minimizar la proporción de microorganismos presentes en la semilla.

Tabla 6. Tabla de Análisis de Varianza (ANOVA) para el modelo ajustado con interacción escarificación y desinfección para el número de hongos en las semillas.

Fuente	gl	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medios	Valor F	Valor p
Escarificación	1	35.4025	35.4025	485.52	0.000
Desinfección	1	10.8900	10.8900	149.35	0.000
Interacción	1	0.4900	0.4900	6.72	0.0024
Error	12	0.8750	0.0729		
Total	15	47.6575			

$R^2=98.16\%$, $R^2_{Adj}=97.70\%$

Según el Análisis de Varianza que se presenta en la Tabla 6, el efecto de la interacción entre la Escarificación y la Desinfección sobre la semilla fue significativo ($p=0.0024$). En el análisis, se obtuvo un $R^2=98.16\%$ y una variabilidad total del experimento del 2.64%, evidenciando un buen control local. Finalmente, el análisis post-ANOVA, presentado en la Tabla 7, indica que todos los tratamientos se agrupan de manera individual, siendo la desinfección de la semilla contribuyó significativamente a la disminución de los hongos presentes en ellas, seguido de la escarificación, corroborando que la cáscara es portadora de microorganismos, al estar directamente expuesta al ambiente.

Tabla 7. Agrupación de tratamientos para la prueba Post – ANOVA de Tukey utilizando un nivel de confianza del 95%.

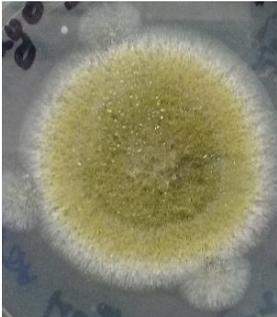
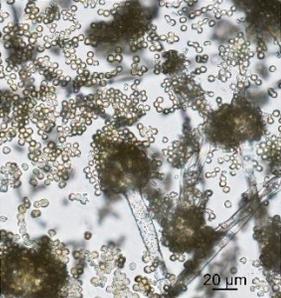
Escarificación	Desinfección	Media	Agrupación
Sin	Sin	5.250	A
Sin	Con	3.250	B
Con	Sin	1.925	C
Con	Con	0.625	D

En la Anexo 1, se presenta la descripción macroscópica de las 24 cepas de hongos identificadas en los cuatro tratamientos y en el Anexo 2, se describen las 29 cepas bacterianas.

5.5.2. Microorganismos fitopatógenos y síntomas causados en plántulas de *P. volubilis*.

Al realizar la comprobación de la patogenicidad de los microorganismos por medio de los postulados de Koch, se logró demostrar la presencia de 8 hongos patógenos, repitiendo el hongo 16 que se observaba un poco distinto en dos de los tres tratamientos en donde se encontraron y 5 bacterias patógenas, descritas en la tabla 8 y 9 respectivamente.

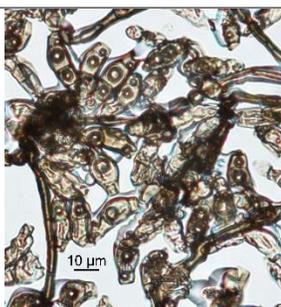
Tabla 8. Descripción de los hongos patógenos encontradas en las semillas de *Plukenetia volubilis*, sacha inchi.

Cepas	Descripción macroscópica	Descripción microscópica 1500x	Síntomas observados en la plantas de <i>P. volubilis</i>	Fuente que respalda patogenicidad
H1⁽¹⁾ <i>Aspergillus</i> <i>sp.</i>	 Micelio aéreo corto esporulado, zonado verso color verde, borde blanco y anverso color crema.	 Hifas hialinas con septos, conidióforos circular con fiálides radiales uniseriados. Presencia de abundantes esporas redondas color verde.	 Hojas marchitas o con clorosis. Marchitamiento en la planta.	Shu <i>et al.</i> 2015
H2⁽¹⁾ <i>Aspergillus</i> <i>tamaris</i>	 Micelio aéreo corto de color gris algodonoso anverso gris claro, borde irregular	 Hifas hialinas aseptadas, conidióforos ovalado con fiálides radiales uniseriados y biseriados. Presencia de esporas globosas sub esféricas color café claro.	 Tallo muy afectado con marchitamiento en la herida, hojas con clorosis.	Paulussen <i>et al.</i> 2017

H12 /H18⁽²⁾
Hypoxylon
investiens



Hongo zonado negro, con borde café, anverso negro, con micelio afelpado..



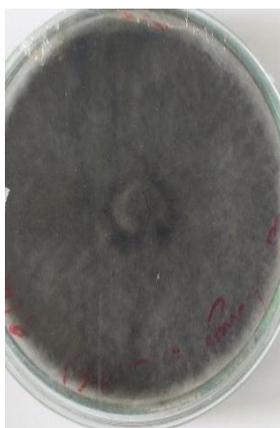
Hifas septadas color café, esporas castañas cilíndricas con concavidad, presentan dos o tres núcleos dispuestos en cada división de la ascospora.



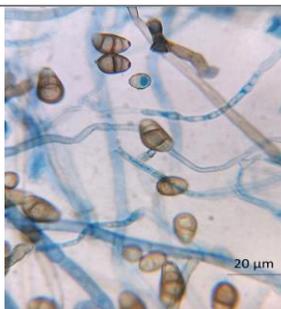
Plantas muy afectadas marchitas, tallos secos, hojas infectadas con clorosis y marchitamiento severo.

San Martin
1999

H16T3⁽³⁾
Lasiodiplodia
pseudotheobromae



Hongo con micelio gris oscuro afelpado, con anverso negro.



Hifas hialinas aseptadas, conidiosporas marrones elipsoidales, ápice y base redondeados, más anchos en el medio. Conidióforos en el apice, cilíndricas.



Plantas muy afectadas marchitas, tallos y hojas secos.

Michereff
2013

H16T4⁽⁴⁾
Curvularia
geniculata



Hongo con micelio gris oscuro a negro afelpado, con anverso negro.



Hifas septadas castañas. Conidióforos geniculados marrones. Conidiosporas septadas, ligeramente curvadas de color café claro.



Plantas muy marchitas, tallos secos, hojas infectadas con clorosis y marchitamiento severo.

Acosta *et al.* 2002.

H21⁽⁴⁾
Fusarium
equiseti



Hongo con micelio blanco con amarillo afelpado, anverso amarillo con anillos más oscuros, zonado.



Hifas hialinas septadas, delgadas. Microconidias de forma elipsoidales, encapsuladas. Macroconidias fusiformes y septadas.



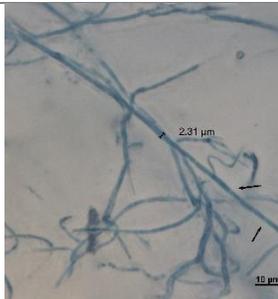
Algunas hojas marchitas o con clorosis alrededor de la herida. Tallo afectado marchito.

Manco
2006

H23⁽⁴⁾
Colletotrichu
m truncatum



Hongo zonado, color crema polvoroso, anverso en tonalidades café claro y crema.



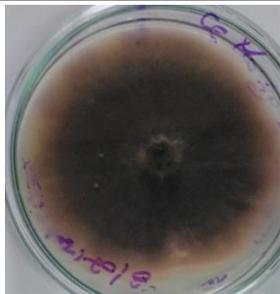
Hifas hialinas septadas. Apresorio conidiales color café claro. Conidias alargadas, ahusadas con ambos extremos agudos.



Algunas hojas marchitas o con clorosis alrededor de la herida. Tallo afectado con presencia de micelio visible.

En cítricos
Huang *et al.* 2013

H24T4⁽⁴⁾
Curvularia
aeria



Hongo negro con micelio afelpado con borde claro, en el anverso es negro con el borde más claro o rosado pálido.



Hifas septadas color café claro. Conidiosporas castañas septadas, elipsoidales ligeramente curveadas. Conidióforos geniculados marrones.



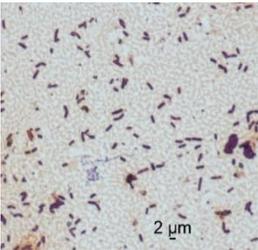
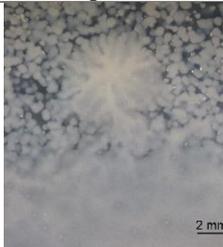
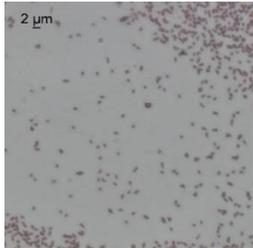
Muchas hojas y tallos marchitos, planta afectada.

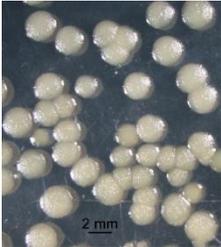
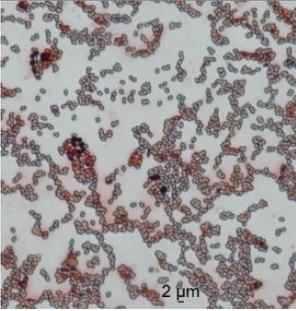
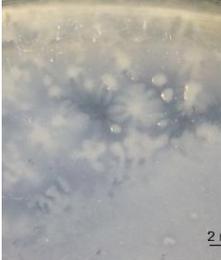
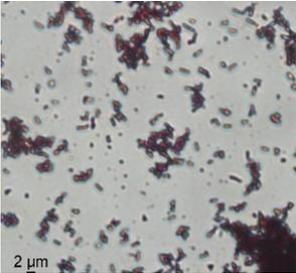
Acosta *et al.* 2002.

- (1) Se aisló de todos los tratamientos
- (2) Se aisló de los tratamientos 1, 2 y 4
- (3) Aislado de los tratamientos 2, 3 y 4
- (4) Aislado del tratamiento 4

Las microfotografías tomadas de las bacterias complementan la descripción macro de las colonias, y con las filogenias realizadas se confirma la asignación taxonómica para las 5 bacterias patógenas encontradas.

Tabla 9. Descripción de las bacterias patógenas encontradas en las semillas de *Plukenetia volubilis*, *sacha inchi*.

Cepa	Descripción macroscópica	Descripción microscópica	Síntomas observados en la plantas de <i>P. volubilis</i>	Bibliografía que respalda la patogenicidad
<p><i>Bacillus methylotrophicus</i> (40%)</p> <p>B2T2/B7T2</p> <p>(B2T2 Igual que B7T2)</p>	 <p>Colonia blanca, irregular, lisa, mucoide, brillante, margen ondulado, elevación convexa, de crecimiento rápido.</p>	 <p>800X.</p> <p>Bacilo esporulado, Gram -.</p>	 <p>Hojas afectadas con clorosis alrededor de la herida.</p>	<p>Leyton <i>et al.</i> 2011 y Rios <i>et al.</i> 2016</p>
<p><i>Paenibacillus uliginis</i> (84%)</p> <p>B3T4</p>	 <p>Colonia irregular con margen lobular, de crecimiento rápido, brillante, muy cremosa, de color blanco/beige, translucido.</p>	 <p>1250x</p> <p>Bacilo de forma redondeada muy pequeño Gram -.</p>	 <p>Hojas y tallo marchitos, además clorosis en las heridas.</p>	<p>Ling <i>et al.</i> 2014</p>

<p><i>Bacillus</i> (88%), <i>B. aryabhatai</i> o <i>B. megaterium</i>.</p>		 <p>800x</p>		<p>Leyton <i>et al.</i> 2011 y Rios <i>et al.</i> 2016</p>
<p>B7T4</p>	<p>Colonia circular lisa convexa, margen entero, beige/amarillo, brillante, cremosa, de crecimiento lento.</p>	<p>Coco-bacilo pequeño Gram -.</p>	<p>Hojas marchitas, además clorosis en las heridas.</p>	
<p><i>Bacillus</i> (90%), <i>B. aerophilus</i>, <i>B. altitudinis</i>, <i>B. pumillus</i></p>		 <p>1250x</p>		<p>Leyton <i>et al.</i> 2011 y Rios <i>et al.</i> 2016</p>
<p>B9T4</p>	<p>Colonia formando bio- película, irregular, elevación plana, brillante, lisa, muy cremosa, de color blanco-beige, de crecimiento rápido</p>	<p>Bacilo alargado muy pequeño Gram -.</p>	<p>Hojas marchitas con clorosis en las heridas.</p>	

Se observó que, de las 24 cepas de hongos y 29 cepas de bacterias aisladas, solo algunas de estas afectaron el tejido vegetal, (Tabla 10).

Tabla 10. Resumen de los microorganismos aislados e identificados presentes en la semillas de *P. volubilis*.

Microorganismos	Cantidad de Cepas aisladas	Cantidad de cepas patógenas aisladas	Géneros patógenos encontrados
Hongos	24	8	<p><i>Fusarium sp.</i> <i>Aspergillus sp.</i> <i>Lasiodiplodia sp.</i> <i>Curvularia sp.</i> <i>Colletotrichum sp.</i> <i>Hypoxyton sp.</i></p>
Bacterias	29	5	<p><i>Bacillus sp.</i> <i>Paenibacillus sp.</i></p>

Se logró establecer que en el caso de los hongos se encontraron 8 cepas de hongos patógenas (H16, diferentes cepas en dos tratamientos), cuyos daños en las plántulas fueron observados en hojas y tallos, con marchitamiento, clorosis y daño general del tejido (Tabla 11).

Tabla 11. Síntomas observados en las plantas de *P. volubilis* causados por las cepas de hongos que resultaron patógenas.

CEPA PATÓGENA	TEJIDO DE LA PLANTA		
	HOJAS	TALLO	ESTADO GENERAL DE LA PLANTA
<i>Aspergillus sp</i> H1-	Marchitas con clorosis.	Con pudrición.	*Marchitamiento severo.
<i>Aspergillus tamaritii</i> H2	Con clorosis.	Con pudrición, seco.	**Marchitamiento moderado.
<i>Hypoxyton investiens</i> H12-H18	Con clorosis y marchitamiento total.	Con pudrición, seco.	*Marchitamiento severo.
<i>Lasiodiplodia pseudotheobromae</i> H16T3	Secas, marchitas.	Con pudrición, secos.	*Marchitamiento severo.
<i>Curvularia geniculata</i> H16T4	Clorosis, marchitas.	Con pudrición, secos.	*Marchitamiento severo.
<i>Fusarium equiseti</i> H21	Clorosis, marchitas.	Con pudrición, secos.	**Marchitamiento moderado.
<i>Colletotrichum truncatum</i> H23	Clorosis.	Con pudrición, secos, con presencia de micelio visible.	**Marchitamiento moderado.
<i>Curvularia aeria</i> H24	Clorosis, marchitas.	Con pudrición, secos.	*Marchitamiento severo.

*Marchitamiento severo: Marchitamiento generalizado, desde el tallo hasta hojas que no fueron inoculadas.

**Marchitamiento moderado: Marchitamiento en las hojas y tallos inoculados.

Para las bacterias se encontraron 5 posibles cepas patógenas (Tabla 12) se observó daños en hojas (clorosis, marchitamiento) y solo en un caso se vieron síntomas en el tallo, estos datos se obtuvieron teniendo en cuenta los síntomas observados que indicaban patogenicidad determinados por la observación de las plántulas de *P. volubilis* que fueron sometidas a las pruebas de patogenicidad.

Tabla 12. Síntomas observados en las plantas de *P. volubilis* causados por las cepas bacterianas que resultaron patógenas.

CEPA PATOGENA	TEJIDO DE LA PLANTA		
	HOJAS	TALLO	ESTADO GENERAL DE LA PLANTA
<i>Bacillus methylotrophicus</i> B2T2/B7T2	Clorosis alrededor de la herida.	No afectado	Solo afecto las hojas.
<i>Paenibacillus uliginis</i> B3T4	Clorosis, marchitas.	Con pudrición, secos.	Efectos en toda la planta, marchitamiento generalizado.
<i>Bacillus (B. aryabhatai o B. megaterium)</i> . B7T4	Clorosis, marchitas.	No afectado	Solo afecto las hojas.
<i>Bacillus (B. aerophilus, B. altitudinis, o B. pumillus)</i> . B9T4	Clorosis alrededor de la herida.	No afectado	Solo afecto las hojas.

5.5.3. Inferencia filogenética para bacterias y hongos patógenos aislados de semillas de *P. volubilis*.

Como complemento de la identificación y caracterización morfológica, se realizó el análisis molecular de la región del rRNA16S para los aislamientos bacterianos, lo que permitió la asignación de estos a dos géneros: *Bacillus* y *Paenibacillus* (Figura 9). La reconstrucción de las relaciones entre los aislamientos, empleando el método de máxima verosimilitud, permitió corroborar la identidad de los aislamientos, la cepa de B3T4 se identificó como perteneciente a la especie *Paenibacillus uliginis* (Figura 10), de la misma forma se identificaron las cepas B2T2 y B7T2 corresponden a *Bacillus methylotrophicus*. Por su parte, la cepa B7T4 presentó asociación con el clado conformado por *Bacillus aryabhatai* y *B. megaterium*, mientras que la cepa B9T4 se encontró en asociación con las especies de *B. aerophilus*, *B. altitudinis* y *B. pumillus* (Figura 11).

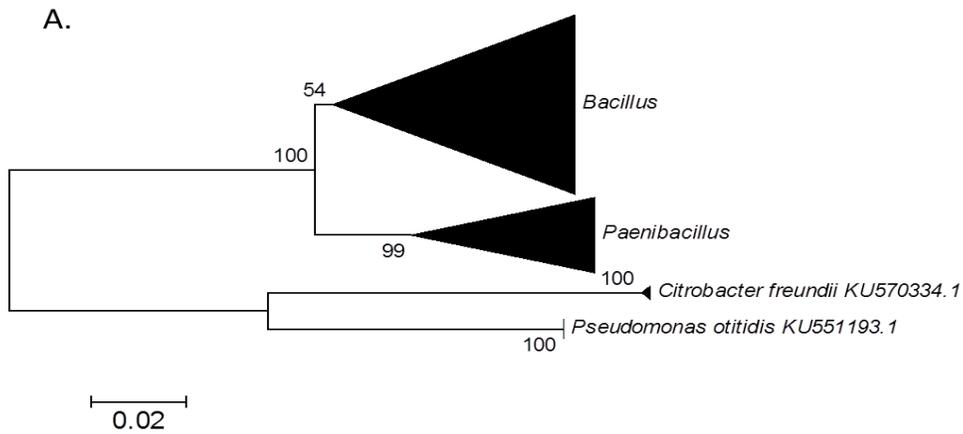


Figura 9. Relaciones filogenéticas de los géneros bacterianos obtenidos por el método de máxima verosimilitud

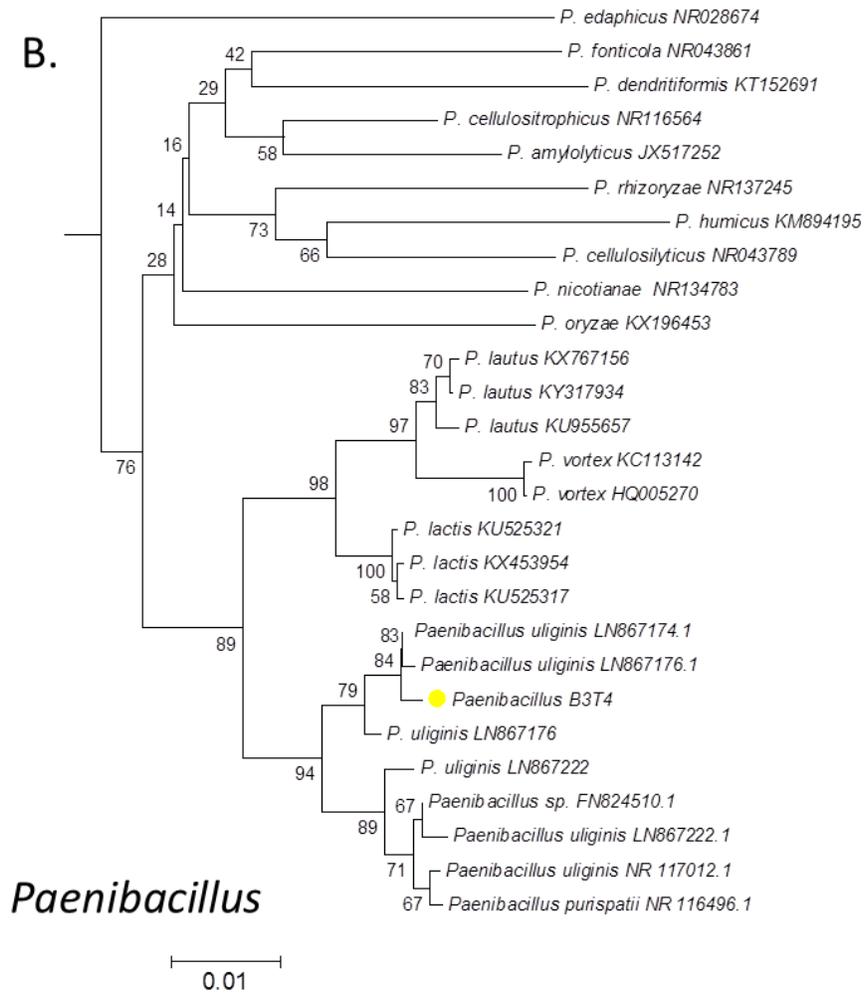


Figura 10. Árbol que presenta los clados principales y asociaciones específicas del género *Paenibacillus*. La cepa aislada se indica con el punto amarillo.

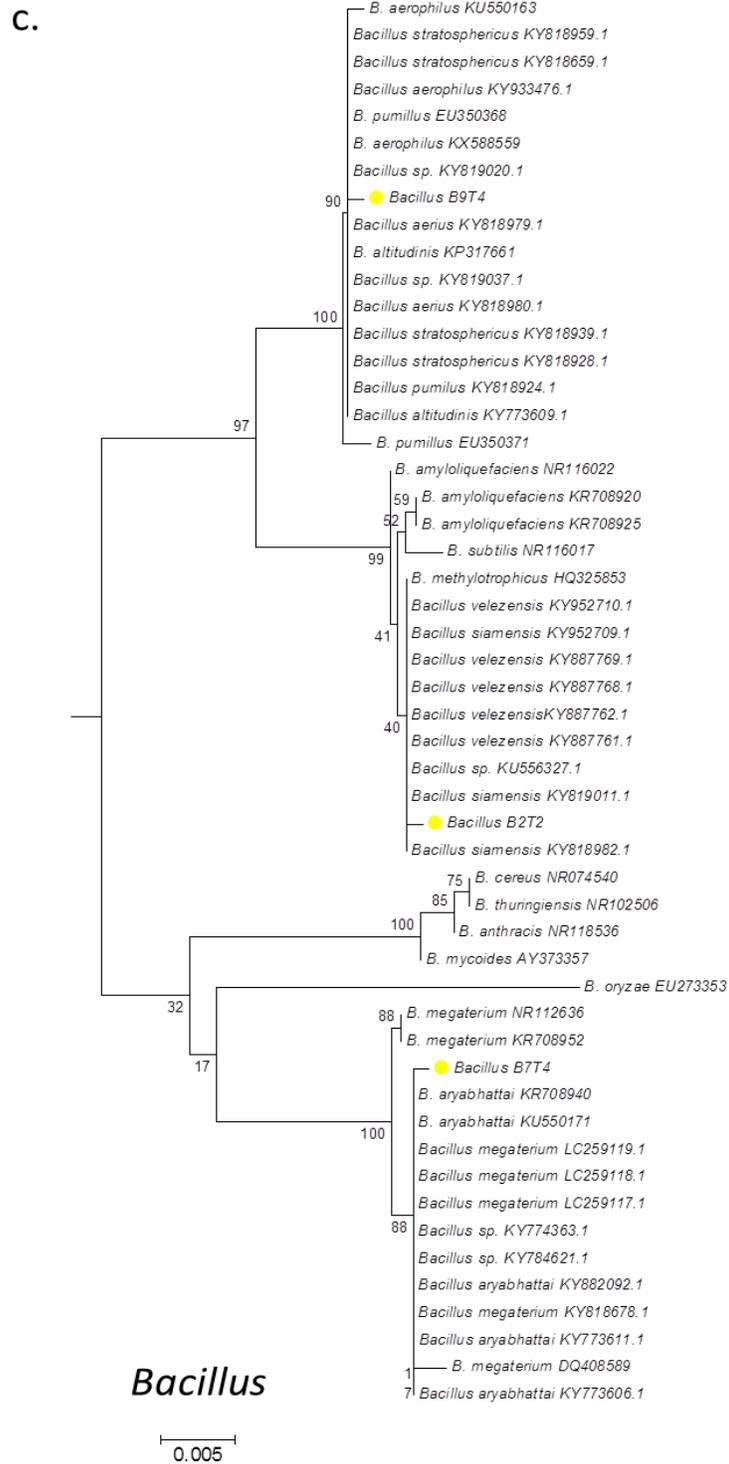


Figura 11. Árbol que presenta los clados principales y asociaciones específicas del género *Bacillus*. Las cepas aisladas se indican por puntos amarillos.

Para los hongos, las secuencias obtenidas para los espaciadores ITS, permitieron la identificación de los aislados en siete géneros: *Aspergillus*, *Hypoxyton*, *Penicillium*, *Lasiodiplodia*, *Curvularia*, *Fusarium* y *Colletotrichum* (Figura 12). Para facilitar la visualización del árbol reconstruido con el método de máxima verosimilitud, se amplió cada agrupación detectada, para evidenciar la asignación de los aislamientos a los géneros mencionados y las asociaciones entre especies (Figura 13-18).

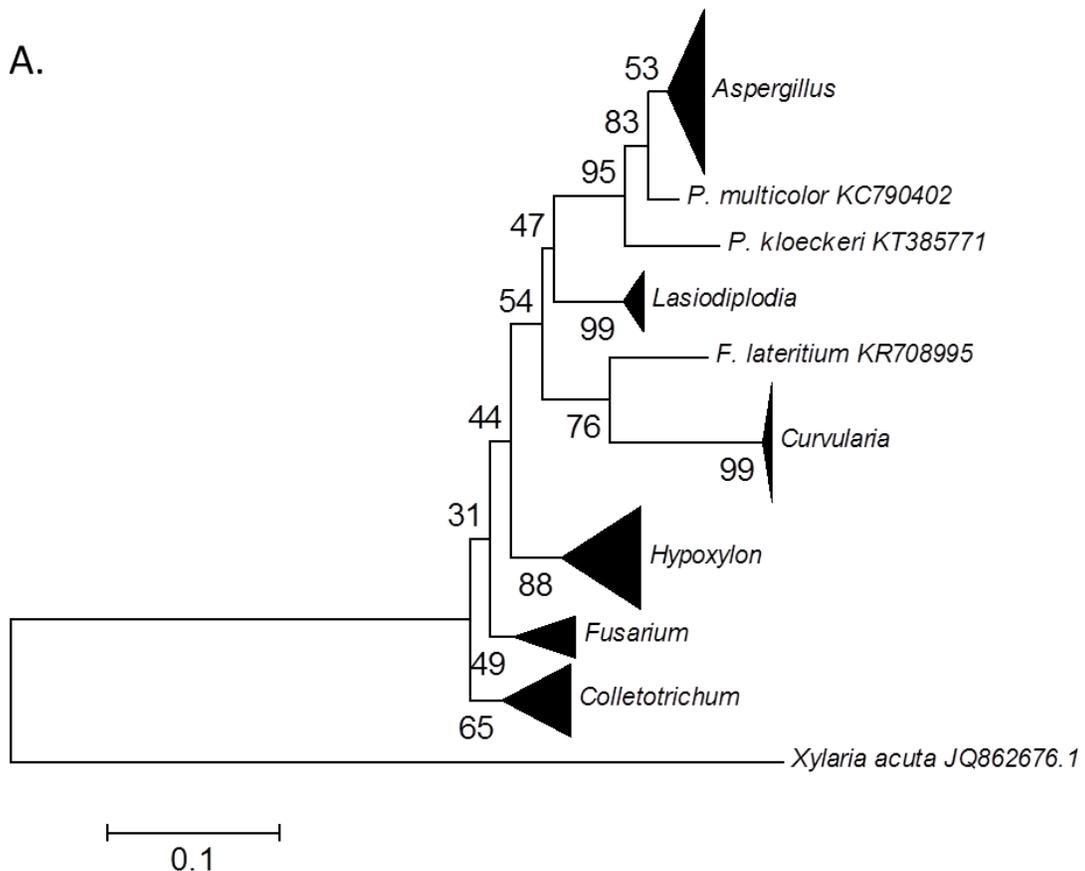


Figura 12. Relaciones filogenéticas de los géneros de hongos obtenidas por el método de máxima verosimilitud.



Figura 13. Relaciones filogenéticas obtenidas de los clados en los que se ilustra la relación entre los aislamientos obtenidos y las especies fúngicas del género *Aspergillus*. Las cepas aisladas se indican con puntos azules

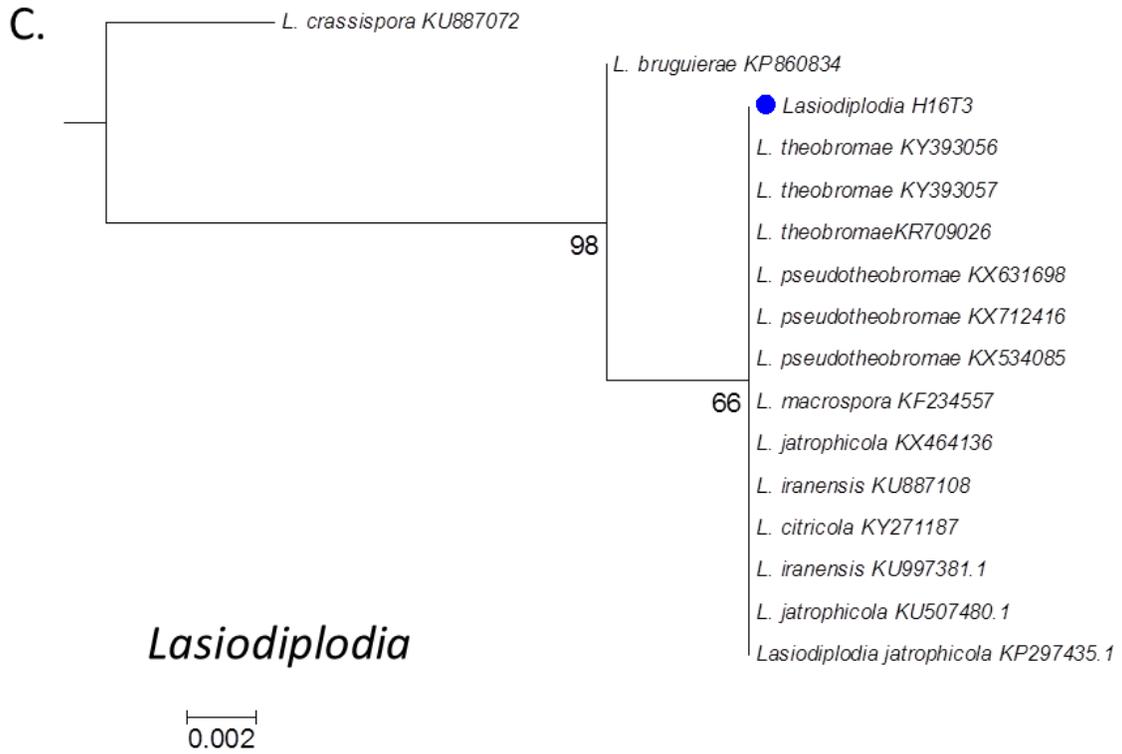


Figura 14. Relaciones filogenéticas obtenidas de los clados en los que se ilustra la relación entre los aislamientos obtenidos y las especies fúngicas del género *Lasiodiplodia*. Las cepas aisladas se indican con puntos azules

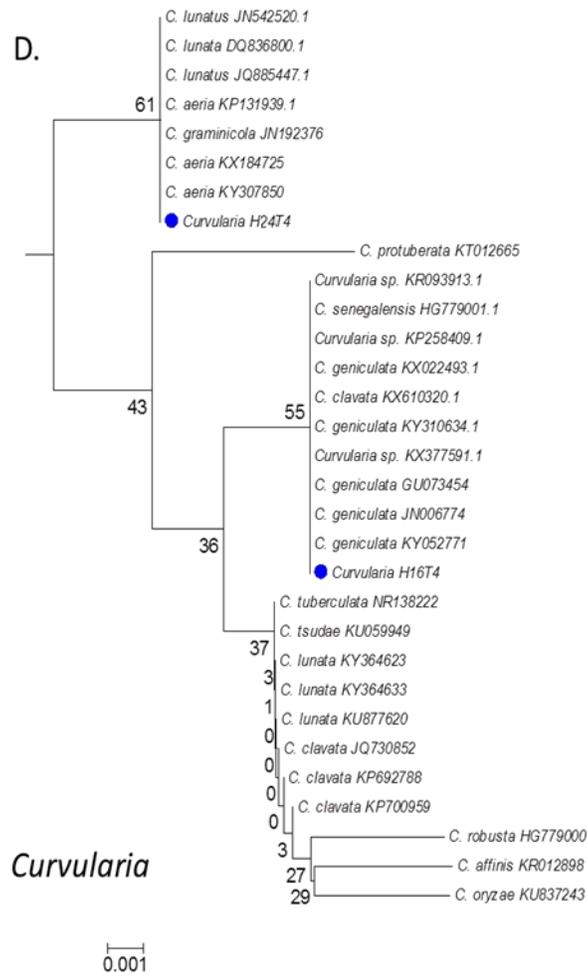


Figura 15. Relaciones filogenéticas obtenidas de los clados en los que se ilustra la relación entre los aislamientos obtenidos y las especies fúngicas del género *Curvularia*. Las cepas aisladas se indican con puntos azules

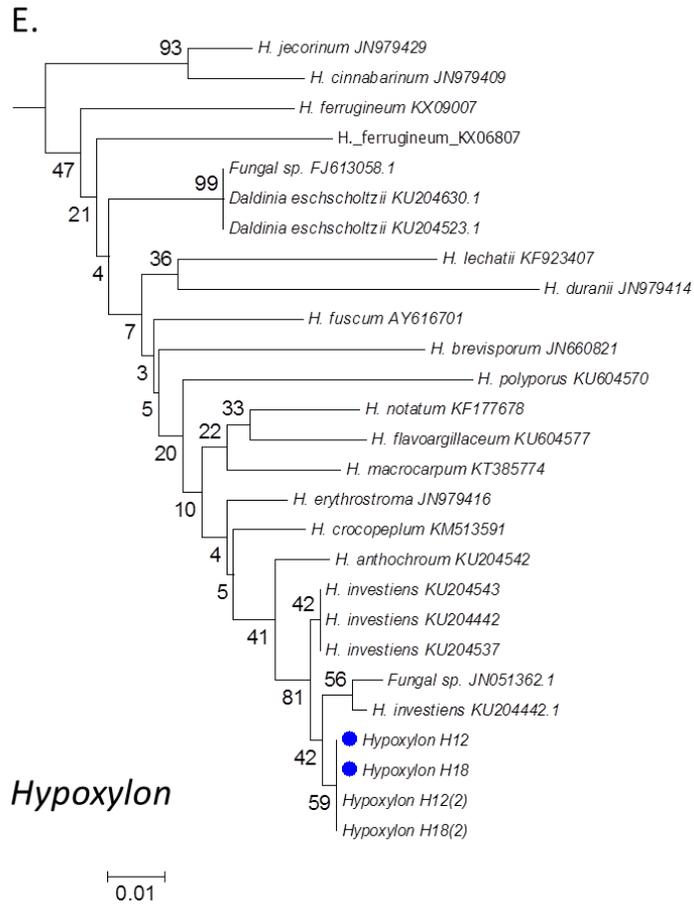


Figura 16. Relaciones filogenéticas obtenidas de los clados en los que se ilustra la relación entre los aislamientos obtenidos y las especies fúngicas del género *Hypoxylon*. Las cepas aisladas se indican con puntos azules

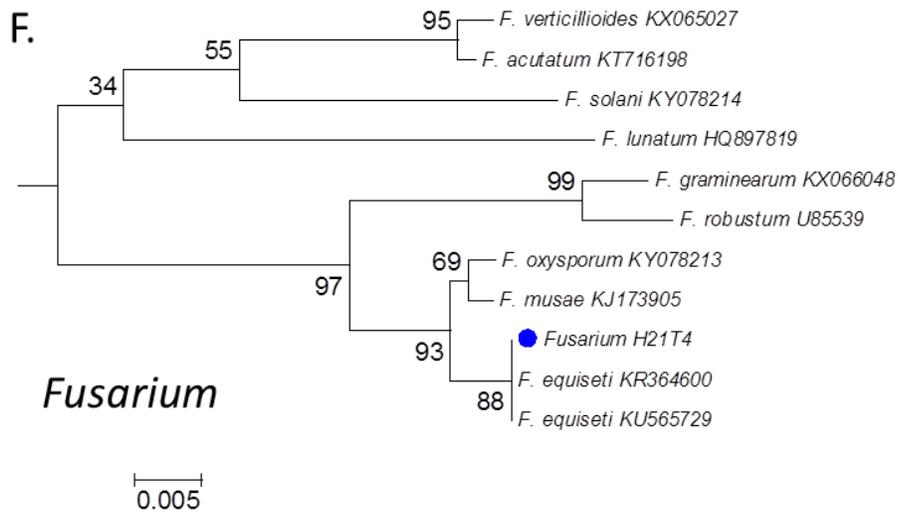


Figura 17. Relaciones filogenéticas obtenidas de los clados en los que se ilustra la relación entre los aislamientos obtenidos y las especies fúngicas del género *Fusarium*. Las cepas aisladas se indican con puntos azules

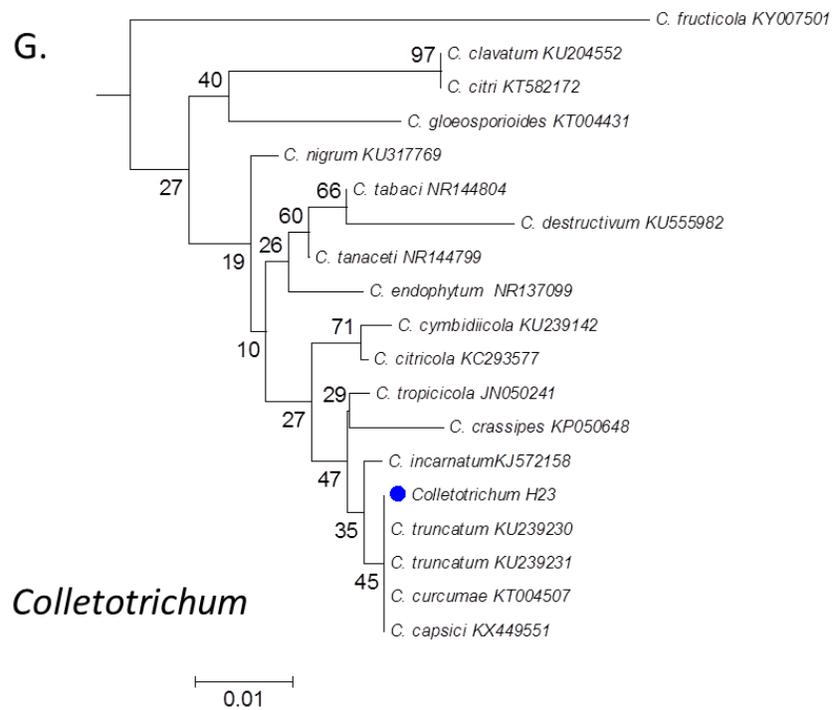


Figura 18. Relaciones filogenéticas obtenidas de los clados en los que se ilustra la relación entre los aislamientos obtenidos y las especies fúngicas del género *Colletotrichum*. Las cepas aisladas se indican con puntos azules

5.6. DISCUSIÓN

La escarificación y la desinfección de las semillas fueron factores que en este trabajo demostraron una disminución significativa en el número de cepas de hongos por unidad experimental, observándose que en el tratamiento SD/SE, donde las semillas tenían la testa sin desinfección, se encontró un mayor promedio de hongos (5,25) mientras que en el tratamiento CD/CE, donde las semillas desnudas fueron desinfectadas, presentó un promedio de 0,61, por unidad experimental, el análisis estadístico efectivamente mostró diferencias significativas ($p= 0,0024$). Estos resultados mostraron de forma clara el impacto de los tratamientos en la presencia de los hongos promedio encontrados en las semillas por unidad experimental (figura 8). Se confirmó que la desinfección con hipoclorito de sodio fue un factor importante en la eliminación de microorganismos, desde hace mucho tiempo se conoce y se emplea en sanidad de semillas con diferentes protocolos, gracias a investigaciones precursoras como las realizadas por Rudolph y Zachowski (1991) donde confirmaron la eficacia del hipoclorito de sodio (NaOCl) como agente minimizador de microorganismos en semillas, además es un método económico y práctico que los agricultores pueden emplear para minimizar la carga microbiana de las semillas.

En cuanto a la cantidad de hongos observados (número de cepas de hongo por tratamiento) en el presente estudio se ordenaron de la siguiente manera, tratamiento 1 (SD/SE) con 13 cepas de hongos diferentes, T2(SD/CE) - T4(CD/CE) ambos con 11 cepas de hongos diferentes, y T3 (CD/SE) con 10, se observa una cantidad superior de cepas de hongos en el tratamiento 1 y menor en el 3 pero estos valores fueron muy similares, entre 13 y 10 tipos de hongos por tratamiento. Pero, para los hongos patógenos se aislaron en mayor proporción en las semillas sin testa (T2, (SD/CE), con 4 y T4, (CD/CE), con 7 hongos patógenos), mientras que de T1, (SD/SE) y T3, (CD/SE), los tratamientos con testa, se aislaron 3 hongos patógenos por tratamiento. Para las bacterias el número de cepas diferentes aumentó desde el tratamiento 1 al 4, sin embargo, de las 29 observadas solo cinco fueron fitopatógenas, en el tratamiento 2 (SD/CE), (2 bacterias), tratamiento 4 ((CD/CE) (3 bacterias)), en los tratamientos 1 (SD/SE) y 3 (CD/SE), ninguna de las bacterias evaluadas causó patogenicidad en las plantas, siendo las bacterias fitopatógenas

las que se aislaron de los tratamientos en donde la semilla fue escarificada, indicando que fueron bacterias propias de la semilla, y en ningún caso bacterias externas asociadas a la testa. El mayor impacto en la reducción de la cantidad de hongos y bacterias fitopatógenas fue en primer lugar la desinfección y el segundo factor la escarificación también ayuda favorablemente a las semillas, siendo que la combinación de los dos factores (desinfección más escarificación) un tratamiento efectivo para disminuir la cantidad de hongos no patógenos (este tratamiento tiene 7 cepas de hongos y 3 cepas de bacterias patógenas, la mayor cantidad), pero deja los patógenos expuestos y por ende la posibilidad que las plantas en el futuro se puedan enfermar. Puesto que la semilla sin testa, se encuentra más expuesta al ataque de microorganismos del ambiente, la cubierta de las semillas es un factor intrínseco de protección, ampliamente estudiado. Las cubiertas o testas de las semillas portan microorganismos, que hacen parte de la flora ambiental normal, pero no necesariamente todos son patógenos, como se observó en esta investigación la mayoría de las bacterias patógenas, fueron aisladas de los tratamientos sin cubierta. Es decir que los hongos y bacterias fitopatógenas se presentaron en mayor proporción en los tratamientos con escarificación, ya que en la testa se encuentra muchos microorganismos, tanto ambientales como endófitos, descomponedores, que pueden competir con los microorganismos patógenos, cuando se elimina la testa la semilla queda desprotegida y es en ese momento que se hacen visibles los microorganismos que pueden afectar fácilmente la semilla y por ende afectar el cultivo. Todos estos resultados se confirman con los observados por Barreto *et al.* (2011), donde se utilizaron tratamientos con o sin desinfección con alcohol al 70% e hipoclorito de sodio al 3%, en la desinfección efectiva de semillas. Se confirmó la eficiencia de la técnica que es un tratamiento adecuado para buscar los microorganismos patógenos. Esto se puede deber a que en el proceso de desinfección se alcanza a eliminar los microorganismos ambientales que probablemente no serían patógenos.

En el presente trabajo se pudo observar que los tratamientos de escarificación y desinfección se complementaron, pues la escarificación eliminó los microorganismos presentes en la testa y después de la desinfección solo quedaron los microorganismos

propios de la semilla. Este resultado también lo describe Jones *et al.* (2016) quien reconoce que la testa es una protección de la semilla, la cual está expuesta a microorganismos que pueden enfermar el cultivo, ya que al estar en contacto con el exterior puede albergar y transportar microorganismos ambientales potencialmente patógenos. Otra posible razón por la cual se obtuvieron estos resultados, es que en *Plukenetia volubilis*, su testa es dura y fuerte, generando un escudo protector para el interior de la semilla que permitiría la sanidad de la semilla, Rojas *et al.* (2008), puntualiza que la morfología de las semillas, como la dureza y el tamaño puede ser un factor de defensa estructural y morfológica contra patógenos, corroborando lo observado en el presente estudio. Los microorganismos encontrados en el interior de la semilla no solo son patógenos sino que también pueden ser endófitos que logran tener relaciones simbióticas con estos permitiendo mejor asimilación de nutrientes, la fijación biológica del nitrógeno, biocontrol de patógenos entre otros. Rives *et al.* 2007.

Teniendo en cuenta los resultados que se expusieron en las filogenias donde se observa la clasificación de los organismos fúngicos y los datos que se muestran en la tabla 11 y 12 con los síntomas observados y los artículos que han reportado los diferentes géneros como posibles patógenos de cultivos a continuación se exponen los géneros comparando las evidencias observadas con otros estudios de *P. volubilis* (Tabla 8 y 9). Aunque las especies *Penicillium expansum* y *Aspergillus niger* no presentaron síntomas o patogenicidad en las plantas de *P. volubilis* se deben tener en cuenta porque aunque no mostraron un impacto negativo sobre la planta, en las pruebas de patogenicidad no reportaron síntomas, se encontraron en todos los tratamientos y fueron muy contaminantes, al parecer es porque estos hongos son considerados ubicuos (Paulussen *et al.* 2017), y muy agresivos pero no se les da mayor importancia ya que su presencia en la planta no van a interferir significativamente en el desarrollo vegetal.

La presencia de *Fusarium sp.* en el presente estudio demuestra una vez más que es un género patógeno, produciendo síntomas como clorosis, marchitamiento y pudrición en los tallos, estos síntomas también descrito en otros trabajos de investigación en diferentes cultivos como Tequida *et al.* (2002) (granos) y en semillas de *Plukenetia volubilis* c por

Manco (2006) donde causó pudrición de raíz, obstrucción y taponamiento de los haces vasculares por lo cual se observaron pudrición y marchitamiento en la planta.

Tequida *et al.* (2002) describen varios géneros de hongos patógenos que actúan durante el desarrollo en los granos, en el presente estudio se observó que los hongos causan diferentes clases de daños, siendo los más importantes la pérdida de capacidad de germinación, decoloración y calentamiento, las especies estudiadas fueron *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium expansum*, *Fusarium moniliforme* y *Fusarium poae*, algunos de esos fueron encontrados en este trabajo de investigación, siendo este último género, *Fusarium* uno de los cuales si presentó síntomas en las pruebas de patogenicidad en el presente estudio y de gran importancia como posible fitopatógeno.

En el cultivo de guayaba (*Psidium guajava* L), se identificaron varios géneros de hongos filamentosos, reportados como fitopatógenos, con la presente investigación se repiten los géneros *Aspergillus*, *Colletotrichum*, *Curvularia*, *Fusarium*, y *Penicillium* que impactan de manera rápida y severa los cultivos de esta especie comercial, (Acosta *et al.* 2002) generando síntomas similares a los observados en el presente trabajo.

Sandoval *et al.* (2013) y Michereff (2013) reportaron al género *Lasiodiplodia* como hongo asociado a la pudrición del pedúnculo de mango (*Mangifera indica* L.), los síntomas descritos concuerdan con los observados en el presente trabajo donde el tallo sufrió pudrición y se secó, afectando la planta hasta el punto de marchitar las hojas. Para el género *Hypoxyton* San Martín (1999) clasificó y caracterizó el género con algunas especies patógenas que afectan los cultivos en plantas, generan marchitamiento generalizado en la planta con pudrición del tallo.

Huang *et al.* (2013) y Cerón *et al.* (2006), reportaron que *Colletotrichum* está entre los géneros de hongos patógenos más importantes desde el punto de vista económico en todo el mundo ya que se consideran patógenos importantes antes y después de la cosecha, estando presente en semillas, así como se encontró en la presente investigación.

Paulussen *et al.* (2017) describen la importancia y patogenicidad del género *Aspergillus* tanto en humanos, en animales, como en plantas, ya que este tiene una facilidad para adaptarse a todos los ambientes, si bien, en el presente trabajo no todos fueron patógenos, la especie *Aspergillus niger* ha sido reportada como productora del moho negro en tomate, lechuga entre otros cultivos. La cepa de hongos, H1 del género *Aspergillus* se encontró en todos los tratamientos evaluados de manera repetitiva en las semillas y se observó en las pruebas de germinación realizadas en el presente trabajo, impidiendo la oclusión de la radícula. Una especie muy cercana y en apariencia a esta especie *Aspergillus flavus* se encuentra reportada como patógena en los cultivos de *Zea maíz* (maíz) con efecto muy agresivo (Shu *et al.* 2015) y en maní (Horn 2006).

En general todos los géneros encontrados en este estudio tienen registros de patogenicidad en otras especies, presentando síntomas similares a los observados en *P. volubilis*. Las investigaciones propiamente en la especie de estudio (*P. volubilis*) son pocas, como la realizada por Layme y Tafur (2008) los cuales investigaron sobre las plagas y enfermedades del cultivo de sacha inchi (*P. volubilis*) encontrando *Rhizoctonia sp.*, *Cercospora sp.*, *Aureobasidium sp.*, y *Cladosporium sp.*, para mancha foliar y *Fusarium sp.*, para pudrición radicular, de todos los datos obtenidos en el presente informe coincide el género *Fusarium sp.* y se proporciona el primer reporte de los patógenos en esta especie vegetal de importancia económica con los géneros *Aspergillus sp.*, *Lasiodiplodia sp.*, *Curvularia sp.*, *Colletotrichum sp.* e *Hypoxylon sp.*

Los géneros de bacterias patógenas encontrados en este estudio fueron *Bacillus sp.* y *Paenibacillus sp.*, el clado *Bacillus sp.*, tiene gran diversidad y pueden generar síntomas adversos en las plantas, como pudrición de tallos, marchitamiento de hojas, daños en semillas y frutos, que generarán pérdidas en los cultivos, Leyton *et al.* (2011) y Rios *et al.* (2016). Aunque no se observó en el presente estudio, algunas bacterias del género *Bacillus* también pueden actuar como biocontroladores contra hongos fitopatógenos de plantas, particularmente, a través de relaciones antagónicas inductoras de muerte celular en términos inminentemente naturales Leyton *et al.* (2011). En cuanto a la cepa bacteriana de

Paenibacillus uliginis, aislada en este estudio, Ling *et al.* (2014), considera que este género afecta la fertilidad y la salud del suelo y como las semillas tienen continuo contacto con este sustrato podría ser responsables de enfermedades en plantas.

Las bacterias ejercieron un efecto antagónico sobre *Fusarium sp.*, en la presente investigación, se veía inhibido o disminuido en presencia de las bacterias, es decir había poca presencia de este hongo cuando las bacterias estaban presentes, aspecto reportado por Leyton *et al.* (2011) y Rios *et al.* (2016).

5.7. LITERATURA CITADA

- ACOSTA, M., CABALLERO, I., ALVARADO, Y. & LEIVA, M. 2002. Micobiota epifítica y contaminantes fungosos del establecimiento in vitro de la guayaba (*Psidium guajava L.*). *Biología Vegetal*, 2(2):67-71. ISSN 2074-8647.
- ALTSCHUL, S.F., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E.W., & LIPMAN, D.J. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology*, 215(3):403-410.
- BARRETO, S., DE REZENDE, D. & BASSAY, L. 2011. Fungos em sementes de plantas ornamentais. *Revista Brasileira De Sementes*, 33 (3):561-573.
- BELLEMAIN, E., CARLSEN, T., BROCHMANN, C., COISSAC, E., TABERLET, P. & KAUSERUD, H. 2010. ITS as an environmental DNA barcode for fungi : an in silico approach reveals potential PCR biases. *BMC Microbiology*, 10(1):189-197.
- CERÓN, L.E., HIGUERA, B., SÁNCHEZ, J., BUSTAMANTE, S. & BUITRAGO, G. 2006. Crecimiento y desarrollo de *Colletotrichum gloeosporioides*, *F. alatae* durante su cultivo en medios líquidos. *Acta biol.Colomb.* 11(1): 99-109.
- DARRIBA, D., Taboada, G.L., Doallo R. & Posada, D. 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature methods*, 9(8):772-773.
- DENNY, T. P. & HAYWARD, A. C. 2001. Gram-negative bacteria. en: Schaad, N.W.; Jones, J.B.; Chun, W.(eds.). *Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria*. American Phytopathological Society (APS). St Paul, MN, USA:151-173.

DALLING, DM. 2002. Ecología de semillas. En: Guariguata M, Kattan G (eds.). Ecología y conservación de bosques neotropicales. Libro universitario Regional. Cartago, Costa Rica. Pp 345-375.

EDGAR, R.C. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic acids research*, 32(5), pp.1792–1797.

FONSECA, J.M. & SABORÍO, D. 2001. Tecnología post cosecha de yuca fresca parafinada (*Manihot esculenta Crantz*) para exportación en Costa Rica. San José, C.R.: MAG. Pp 56.

GOMEZ, E., ALVAREZ, A. & LLANO, E. 2005. Identificación y caracterización de cepas de *Ralstonia solanacearum* raza 2, agente causante del Moko de plátano en Colombia. *Fitopatología Colombiana* ISSN: 0012-0014 28 (2):71-75.

HALL, T.A., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. In *Nucleic acids symposium series*. [London]: Information Retrieval Ltd., c1979-c2000., pp. 95-98.

HORN, B.W. 2006. Relationship between soil densities of *Aspergillus* species and colonization of wounded peanut sedes. *Canadian Journal Of Microbiology*, 52(10):951-960.

HUANG, F., CAI, L., & HYDE, K. D. 2013. *Colletotrichum* species associated with cultivated citrus in China. *Fungal Diversity* (2013) 61:61–74. International Rules for seed Testing Association 1999. Seed Science and Technology RULES, 27 Supplement.

INTERNATIONAL RULES FOR SEED TESTING ASSOCIATION. 1999. Seed Science and Technology RULES, 27 Supplement.

JACAS, J., CABALLERO, P. & AVILLA, J. 2005. El control biológico de plagas y enfermedades. Universitat Jaume I. Pp 116.

JANZEN, D.H. & VAZQUEZ-YANES, C. 1991. Aspects of tropical seed ecology of relevance to management of tropical forested wild lands. En: Gomez-Pompa A, Whitmore

TC, Hadley M, editors. Rainforest Regeneration and Management. MAB Book Series 6. Paris: Parthenon Publishing Group, 137–154.

JONES, C., STEVENS, M., JOLLEY, V., HOPKINS, B., JENSEN, S., TURNER, D. & STETTLER, J. 2016. Evaluation of thermal, chemical, and mechanical seed scarification methods for 4 Great Basin lupine species. *Native Plants Journal* (University Of Wisconsin Press), 17(1):5-17.

KIMURA, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol*, 16(2):111-120.

LAYME, J. J. & TAFUR, A. 2008. Plagas y enfermedades en el cultivo de “Sacha Inchi” *Plukenetia volubilis* en la provincia de Rodríguez de Mendoza, Región Amazonas. CNPB - Comisión Nacional de Promoción del Biocomercio. Pp 49.

LAYTON, C., MALDONADO, E., MONROY, L., CORRALES, L. C. & SÁNCHEZ, L. G. 2011. *Bacillus spp.*; perspectiva de su efecto biocontrolador mediante antibiosis en cultivos afectados por fitopatógenos. *NOVA - Publicación científica en ciencias biomédicas*. 9 (15):113-214.

LEBONAH, D.E., DILEEP, A., CHANDRASEKHAR, K., SREEVANI, S. B. & PRAMODA KUMARI, J. 2014. DNA Barcoding on Bacteria : A Review. *Advances in Biology*. Pp 9.

LING, N., WANG, D., ZHU, C., SONG, Y., YU, G., RAN, W., HUANG, Q., GUO, S. & SHEN, Q. 2014. Response of the population size and community structure of *Paenibacillus spp.* to different fertilization regimes in a long-term experiment of red soil. *Plant & Soil*, 383(1/2):87-98.

MANCO, E. 2006. Situación y avances del cultivo de sachá inchi en el Perú. Subdirección de Recursos Genéticos y Biotecnología Estación Experimental Agraria “El Porvenir” – Tarapoto, Perú. Pp 11.

MICHEREFF, S.M. 2013. Manejo de la Antracnosis y Pudrición de Pedúnculo de Mango en el Contexto de las Nuevas Especies de Patógenos Asociados, con Énfasis en Epidemiología y Sensibilidad a los Fungicidas. XL Congreso Nacional y XV Congreso Internacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología. Revista Mexicana de Fitopatología, 31 (Suplemento):S41-S42.

PACHECO, C. 1989. Importancia de la patología de semillas para los programas de semillas. Fitopatología Colombiana, 13:20-30.

PAULUSSEN, C., HALLSWORTH, J., ÁLVAREZ, S., NIERMAN, W., HAMILL, P., BLAIN, D., REDIERS, H. & LIEVENS, B. 2017. Ecology of aspergillosis: insights into the pathogenic potency of *Aspergillus fumigatus* and some other *Aspergillus* species. *Microbial Biotechnology*, 10(2):296-322.

RIOS, C., CARO, J. M., BERLANGA, D. I., RUIZ, M. F., ORNELAS, J. J., SALAS, M. A., VILLALOBOS, E. & GUERRERO, V. M. 2016. Identification and antagonistic activity in vitro of *Bacillus spp.* and *Trichoderma spp.* isolates against common phytopathogenic fungi. Revista Mexicana de Fitopatología. 34(1):84-99.

RIVES, N., ACEBO, Y. & HERNÁNDEZ, A. 2007. Bacterias promotoras del crecimiento vegetal en el cultivo del arroz (*Oryza sativa L.*). perspectivas de su uso en cuba. Cultivos Tropicales, 28(2):29-38

ROJAS, R., CORREA, A. & SERNA, E. 2008. Sombra de semillas, supervivencia de plántulas y distribución espacial de la palma *Oenocarpus bataua*, en un bosque de los andes colombianos. Acta Biol. 30 (89):135-150.

RUDOLPH, K., & ZACHOWSKI, M. 1991. Reduction of bacterial blight infestation of cotton seeds by treatment with sodium hypochlorite. *Journal Of Phytopathology*, 131 (1):53-58.

- SANDOVAL, M., NIETO, D., SANDOVAL, S., TÉLIZ, D., OROZCO, M. & SILVA, V. 2013. Hongos asociados a pudrición del pedúnculo y muerte descendente del mango (*Mangifera indica* L.). *Agrociencia*, 47(1):61-73.
- SAN MARTIN, F.E. 1999. Algunas especies de *Hypoxylon* (Pyrenomycetes, Xylariaceae) de Mexico. *Acta Botanica Mexicana*, 47:31-53.
- SHU, X., LIVINGSTON, D. P., FRANKS, R. G., BOSTON, R. S., WOLOSHUK, C. P. & PAYNE, G. A. 2015. Tissue-specific gene expression in maize seeds during colonization by *Aspergillus flavus* and *Fusarium verticillioides*. *Mol. Plant Pathol.* 16:662-674.
- TAMURA, K., STECHER, G., PETERSON, D., FILIPSKI, A. & KUMAR, S. 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular biology and evolution*, 30(12):2725-2729.
- TEQUIDA, M., CORTEZ, M., ROSAS, E.C., LÓPEZ, S. & CORRALES, C. 2002. Efecto de extractos alcohólicos de plantas silvestres sobre la inhibición de crecimiento de *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium expansum*, *Fusarium moniliforme* y *Fusarium poae*. *Rev Iberoam Micol.* 19:84-88.
- VÁSQUEZ, A. & LÓPEZ, C. 2012. Identificación de polimorfismos en genes candidatos de resistencia en yuca (*Manihot esculenta* Crantz). *Acta Agronómica.* 61 (2):133-142.
- VECCO, D., PINEDO, R. & FERNÁNDEZ, M. 2015. Nicho ecológico de *Pseudophilothrips* sp. (Tubulifera: Phlaeothripidae) en el sistema agroecológico del sacha inchik (*Plukenetia volubilis* L.) en San Martín, Perú. *Rev. Protección Veg.* 30(1):2-5.

6. CONCLUSIONES GENERALES

Se concluye que las semillas de *P. volubilis* no tiene ningún tipo de latencia y la germinación es promovida por temperaturas alternas de 20/30 y 25/35 °C. La germinación de esta especie ocurre en varias condiciones lumínicas (luz, oscuridad, rojo y rojo lejano) y tiene un comportamiento ortodoxo en el almacenamiento. Es por esto que, en condiciones

naturales, las semillas de esta especie pueden componer los bancos de semilla *in situ*, podrían colonizar hábitats perturbados, a pesar que sus plantas podrían tolerar ambientes de borde e interior de bosque. Desde el punto de vista de la bioprospección, esta especie puede ser guardada por períodos largos en bancos de semilla *ex situ* y puede ser sembrada en condiciones de alta luminosidad, aunque podrían tolerar áreas con penumbra.

La combinación de los tratamientos de escarificación y desinfección permitió observar la sanidad de la semilla, demostrando que la desinfección después del proceso de escarificación, permitió la eliminación de los microorganismos no patógenos (ambientales) presentes en el interior de la semilla y dejó expuestos los microorganismos patógenos.

El hongo *Aspergillus sp.* (H1) se comportó como patógeno impidiendo la germinación de las semillas, ya que estuvo presente en todos los tratamientos y en las semillas que no germinaron. Además, las plantas infectadas presentaron marchitamiento severo, tanto en el tejido inoculado como en hojas y tallos sin heridas, siendo este el patógeno más representativo.

En este estudio se corroboró la patogenicidad del género *Fusarium*, reportado anteriormente por otros autores, además se proporciona el primer reporte de patogenicidad para los géneros fúngicos como *Aspergillus*, *Lasiodiplodia*, *Curvularia*, *Colletotrichum* e *Hypoxyton* en plantas de *P. volubilis*., causando daño en hojas, tallos y marchitamiento generalizado.

En cuanto a bacterias, se presenta este primer reporte de la patogenicidad en *P. volubilis*, de los géneros *Bacillus* y *Paenibacillus*. Con las posibles especies *B. methylotrophicus*; *B. aryabhatai*, *B. megaterium*; *B. aerophilus*, *B. altitudinis*, *B. pumillus* y *Paenibacillus uliginis*

7. RECOMENDACIONES

Se recomienda que en estudios posteriores se realicen evaluaciones del impacto de las interacciones entre hongos y bacterias presentes en las semillas de *P. volubilis* (Sancha

inchi), haciendo énfasis en el género *Bacillus*, considerando que los resultados obtenidos fueron muy preliminares, pero estudios más detallados permitirían entender mejor las habilidades antagonicas que puede ofrecer este género bacteriano.

Evaluar el efecto de los microorganismos patógenos en el cultivo, midiendo la severidad e incidencia en campo y a su vez profundizar en el conocimiento de las posibles relaciones antagonicas para desarrollar en el futuro un control biológico para potencializar el uso comercial de *P. volubilis*.

8. LITERATURA GENERAL CITADA

ARTEAGA, L. 2007. El tamaño de las semillas de *Vismia glaziovii* Ruhl. (Guttiferae) y su relación con la velocidad de germinación y tamaño de la plántula. Rev. Peru. biol. 14(1):017- 020.

ÁVILA, A., DE MAGALHÃES, A., DES DE LIMA, E., DA SILVA, C. & SILVA, H. 2015. Environmental factors on seed germination, seedling survival and initial growth of sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.), Journal of Seed Science 37 (2):111-116.

CAI, Z.Q. 2011. Shade delayed flowering and decreased photosynthesis, growth and yield of Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis*) plants. Industrial Crops and Products 34:1235-1237.

CHIRINOS, R., ZULOETA, G., PEDRESCHI, R., MIGNOLET, E., LARONDELLE, Y. & CAMPOS, D. 2013. Sacha inchi (*Plukenetia volubilis*): A seed source of polyunsaturated fatty acids, tocopherols, phytosterols, phenolic compounds and antioxidant capacity. Food Chemistry 141:1732-1739.

DALLING, D.M. 2002. Ecología de semillas. En: Guariguata M, Kattan G (eds.). Ecología y conservación de bosques neotropicales. Libro universitario Regional. Cartago, Costa Rica. Pp 345-375.

ESCOBAR, D. F. & TORRES, A. M. 2013. Morphology, ecophysiology and germination of seeds of the neotropical tree *Alibertia patinoi* (Rubiaceae). Revista de Biología Tropical, 61(2):547-556.

FANALI, C., DUGO, L., CACCIOLA, F., BECCARIA, M., GRASSO, S. & DACHÀ, M. 2011. Chemical characterisation of Sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.) oil. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 59(4):13043-13049.

FU, Q., NIU, L., ZHANG, Q., PAN, B-Z., HE, H. & XU Z.F. 2015. Benzyladenine treatment promotes floral feminization and fruiting in a promising oilseed crop *Plukenetia volubilis*. Industrial Crops and Products 59:295-298.

GARMENDIA, F., PANDO, R. & RONCEROS, G. 2011. Efecto del aceite de Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis* L) sobre el perfil lipídico en pacientes con hiperlipoproteinemia. Rev Peru Med Exp Salud Pública 28(4):628-32.

GUTIÉRREZ, L.F., ROSADA, L.M. & JIMÉNEZ, A. 2011. Chemical composition of Sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.) seeds and characterisation of their lipid fraction. Grasas y aceites 62:76-83.

HONG, T. D. & ELLIS, R. H. 1996. A protocol to determine seed storage behaviour. (Technical Bulletin No. 1) Retrieved from International Plant Genetic Resource Institute <http://www.cbd.int/doc/case-studies/tttc/SeedStorage.pdf>. Pp 62.

JACAS, J., CABALLERO, P. & AVILLA, J. 2005. El control biológico de plagas y enfermedades. Universitat Jaume I. Pp 116.

LAGARDA, M. J., GARCÍA-LLATAS, G. & FARRÉ, R. 2006. Analysis of phytosterols in foods. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 41:1486-1496.

LAYME, J.J. & TAFUR, A. 2008. Plagas y enfermedades en el cultivo de “Sacha Inchi” *Plukenetia volubilis* en la provincia de Rodríguez de Mendoza, Región Amazonas. CNPB - Comisión Nacional de Promoción del Biocomercio. Pp 49.

MANCO, E. 2006. Situación y avances del cultivo de sachá inchi en el Perú. Subdirección de Recursos Genéticos y Biotecnología Estación Experimental Agraria “El Porvenir” – Tarapoto, Perú. Pp 11.

POSADA, P., OCAMPO, J. & SANTOS, L. 2014. Estudio del comportamiento fisiológico de la semilla de tres especies cultivadas de *Passiflora L.* (Passifloraceae) como una contribución para la conservación *ex situ*. Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas, 8(1):9-19.

RAO, N.K., HANSON, J., DULLO, M.E., GHOSH, K., NOVELL, D. & LARINDE, M. 2007. Manual para el manejo de semillas en bancos de germoplasma. Manuales para el manejo de bancos de germoplasma No.8. Bioversity International, Roma. Pp 182.

TORRES, M. 2012. Efectos del ablandamiento y escarificado en la germinación de semillas del sacha inchi (*Plukenetia volubilis L.*) Ecotipo pinto recodo en Pucallpa. Universidad Nacional de Ucayali. Facultad de Ciencias Agropecuarias y Agroindustriales. Pp 3.

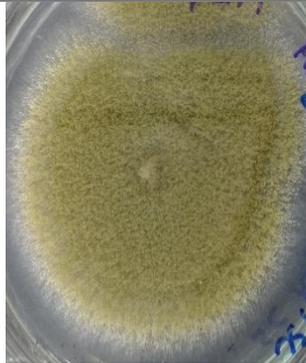
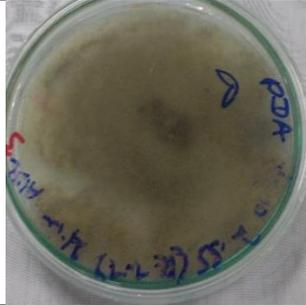
VARGAS, J. A., DUQUE, O. L. & TORRES, A. M. 2015. Germinación de semillas de cuatro especies arbóreas del bosque seco tropical del Valle del Cauca, Colombia. Rev. Biol. Trop. 63 (1):249-261.

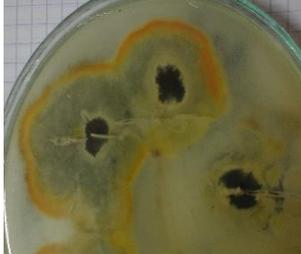
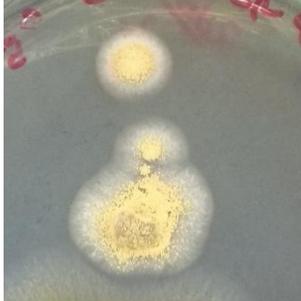
ZULETA, E.C., RIOS, L.A. & BENJUMEA, P.N. 2012. Oxidative stability and cold flow behavior of palm, Sacha-inchi, Jatropha and castor oil biodiesel blends. Fuel Process. Technol. 102:96-101

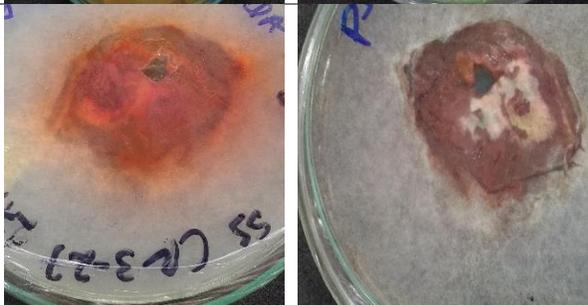
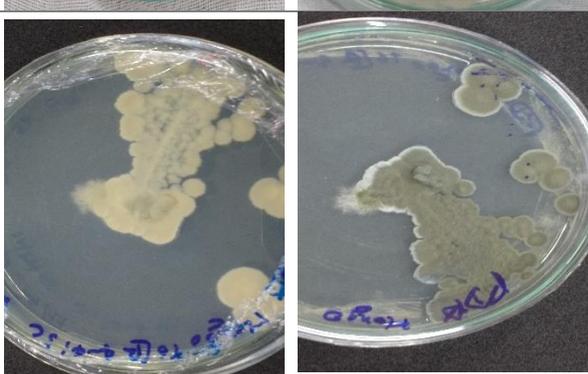
9. ANEXOS

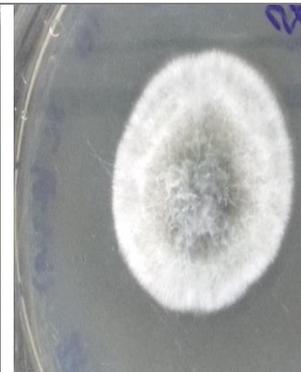
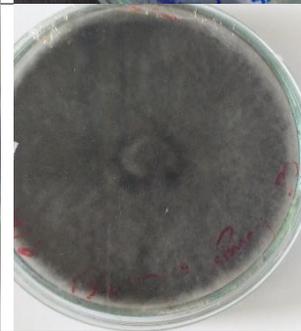
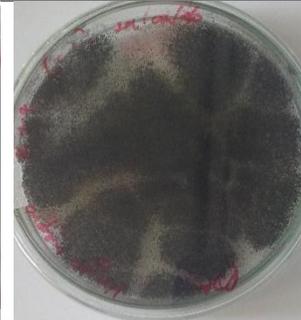
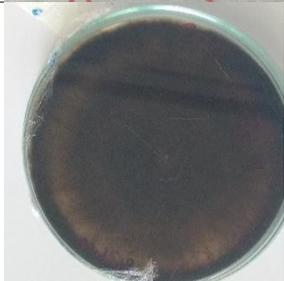
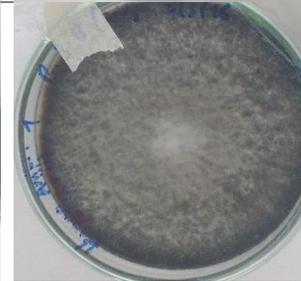
Descripción inicial de las 24 cepas de hongos diferentes que se observaron en los cuatro tratamientos en la sanidad de las semillas.

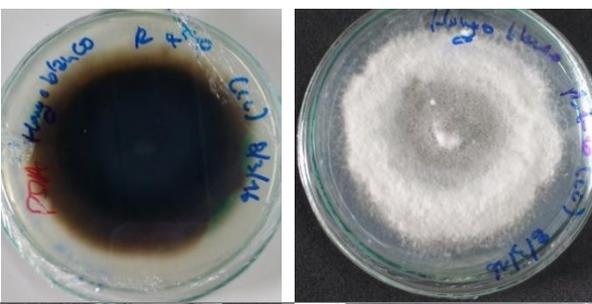
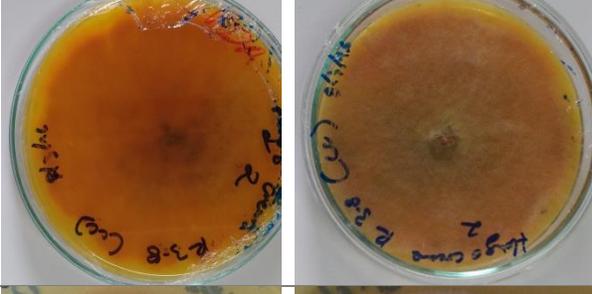
Anexo 1. Descripción macroscópica de hongos encontradas en las semillas de sachá inchi (*P. volubilis*).

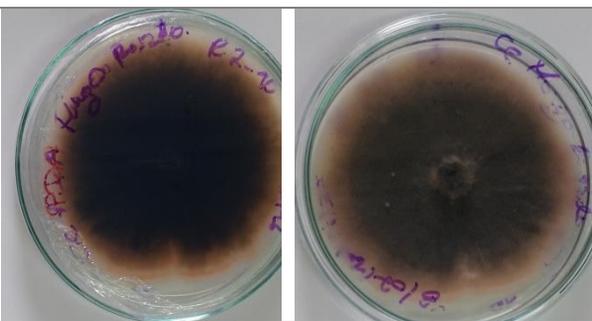
Cepas	Descripción	Fotografía	
		Envés	Haz
1	Hongo micelio color verde esporulado (zonado) de textura granulosa, el borde es más claro, blanco, anverso de color crema.		
2	Hongo micelio color gris algodonoso con micelio aéreo de pocos milímetros de altura (3mm) enverso gris claro borde irregular.		
3	Hongo micelio color blanco afelpado, encima de las semillas, presenta pequeño diámetro, no purificado.		

<p>4</p> <p>Hongo micelio color blanco, algodonoso en forma de abanico encima de la semilla, en cultivo puro zonado, anverso blanco.</p>		
<p>5</p> <p>Hongo micelio color blanco con gris afelpado, anverso color gris borde negro.</p>		
<p>6</p> <p>Hongo micelio color amarillo con el borde naranja alrededor de las semillas, zonado.</p>		
<p>7</p> <p>8</p> <p>Hongo con micelio, color amarillo crema polvoroso, el borde es blanco, anverso amarillo crema.</p>		
<p>9</p> <p>Hongo micelio color gris muy invasivo, algodonoso, de crecimiento rápido con micelio aéreo alto en el extremo del micelio es de color negro, anverso gris.</p>		

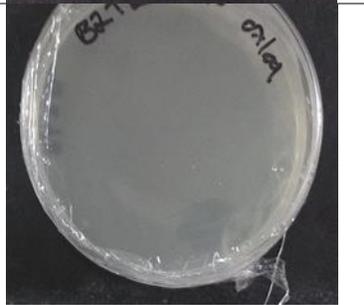
<p>10</p> <p>Hongo micelio color crema afelpado radiado con extremo del micelio aéreo naranja, muy invasivo, de rápido crecimiento, por el anverso es amarillo oscuro.</p>	
<p>11</p> <p>Hongo micelio color rojo zonado, no se logró el cultivo puro, con invasión del hongo 9.</p>	
<p>12</p> <p>Hongo micelio color negro, borde café, zonado anverso negro, con micelio aéreo afelpado. En pruebas moleculares igual H18.</p>	
<p>13</p> <p>Hongo micelio color verde esporulado, de textura dura un poco algodonosa, irregular con borde blanco, anverso opaco amarillento.</p>	

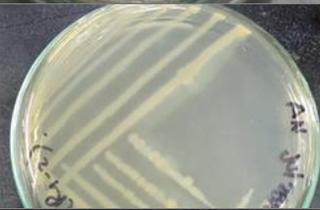
<p>14 Hongo micelio color blanco afelpado, zonado, en el anverso color crema.</p>		
<p>15 Hongo micelio color verde esporulado (zonado) de textura granulosa, el borde es más claro, blanco, anverso de color crema. (Es el mismo hongo 1).</p>		
<p>16 Hongo con micelio aéreo gris oscuro afelpado, con anverso negro.</p>		
<p>17 Hongo micelio color negro presenta micelio aéreo corto polvoroso, esporulado, con agregados circulares, anverso color crema.</p>		
<p>18 Hongo afelpado, zonado de color gris oscuro y el centro es gris claro presenta anverso radial café en varias tonalidades que forman anillos (zonación). En pruebas moleculares igual H12.</p>		

<p>19</p> <p>Hongo micelio color blanco con micelio aéreo algodónoso, zonado, el centro es de color gris claro, borde irregular, anverso negro con borde claro, beige.</p>	
<p>20</p> <p>Hongo micelio color beige, crema -amarillo, encima de las semillas, corrugado en el centro, anverso de color crema.</p>	
<p>21</p> <p>Hongo blanco con amarillo afelpado, anverso amarillo con anillos más oscuros, zonado.</p>	
<p>22</p> <p>Hongo micelio color crema con afelpado, zonado, invade toda la caja, en el anverso es amarillo y naranja.</p>	
<p>23</p> <p>Hongo color crema polvoroso, esporulado, zonado, con anillos alternado, en varios tonos beige, creme y blanco, anverso en tonalidades café claro y crema, zonado.</p>	

<p>24</p> <p>Hongo negro con micelio afelpado con borde claro, en el anverso es negro con el borde más claro o rosado pálido</p>	
--	--

Anexo 2. Descripción macroscópica de bacterias encontradas en las semillas de sacha inchi (*P. volubilis*).

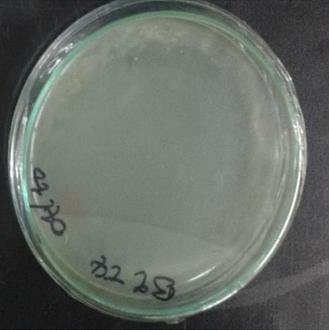
Cepa	Descripción macroscópica	Fotografía
<p>B1T1</p>	<p>Colonia amarilla, rugosa, brillante, borde irregular, de crecimiento lento.</p>	
<p>B2T1</p>	<p>Colonia formando bio-película, mucoide, brillante, lisa, muy cremosa, de color blanco-beige, de crecimiento rápido.</p>	
<p>B1T2</p>	<p>Colonia blanca, rugosa, mucoide, brillante, borde irregular, de crecimiento lento.</p>	

<p>B2T2</p>	<p>Colonia blanca, lisa, mucoide, brillante, borde irregular, de crecimiento rápido.</p> 
<p>B3T2</p>	<p>Colonia blanca, lisa, opaca, seca, de crecimiento rápido.</p> 
<p>B4T2</p>	<p>Colonia beige, lisa, mucoide, brillante, de crecimiento rápido.</p> 
<p>B5T2</p>	<p>Colonia blanca, rugosa, mucoide, brillante, borde irregular, de crecimiento rápido.</p> 
<p>B6T2</p>	<p>Colonia blanca, lisa, mucoide, opaca, de crecimiento rápido.</p> 

<p>B7T2</p>	<p>Colonia blanca, lisa, mucoide, brillante, de crecimiento rápido, borde irregular.</p> 
<p>BAT3</p>	<p>Colonia blanca, lisa, mucoide, brillante, de crecimiento rápido.</p> 
<p>BBT3</p>	<p>Colonia blanca, translúcida, lisa, mucoide, brillante, de crecimiento lento.</p> 
<p>BCT3</p>	<p>Colonia blanca/beige, lisa, mucoide, brillante, de crecimiento rápido.</p> 

<p>BDT3</p> <p>Colonia blanca, lisa, mucoide, opaca, de crecimiento lento.</p>	
<p>BET3</p> <p>Colonia blanca/beige, lisa, opaca, seca, de crecimiento lento.</p>	
<p>BFT3</p> <p>Colonia blanca, lisa, mucoide, opaca, de crecimiento rápido.</p>	
<p>BGT3</p> <p>Bacteria opaca beige. No se lograron purificar</p>	
<p>BHT3</p> <p>Bacteria brillante, beige translucida. No se lograron purificar</p>	

<p>B1T4</p>	<p>Colonia blanca/beige, lisa, mucoide, opaca, de crecimiento rápido.</p> 
<p>B2T4</p>	<p>Colonia beige, rugosa, mucoide, brillante, cremosa, de crecimiento rápido.</p> 
<p>B3T4</p>	<p>Colonia redonda con borde irregular, de crecimiento rápido, brillante, muy cremosa, de color blanco/beige, translucido.</p> 
<p>B4T4</p>	<p>Colonia blanca, lisa, mucoide, brillante, de crecimiento rápido.</p> 

<p>B6T4</p>	<p>Colonia blanca, rugosa, mucoide, brillante, borde irregular, de crecimiento rápido.</p>	
<p>B7T4</p>	<p>Colonia redonda lisa, beige, brillante, borde liso y cremosa, de crecimiento lento.</p>	
<p>B8T4</p>	<p>Colonia redonda lisa, blanca, brillante, cóncava, borde liso y cremosa, de crecimiento lento.</p>	
<p>B9T4</p>	<p>Colonia formando bio-película, brillante, lisa, muy cremosa, de color blanco-beige, de crecimiento rápido</p>	
<p>B10T4</p>	<p>Colonia beige, lisa, mucoide, brillante, de crecimiento rápido.</p>	

B11T4

Bacteria opaca en el borde derecho, beige. No se logro purificar.

B12T4

Bacteria opaca en el borde inferior, beige/amarilla. No se logro purificar.

