

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA  
LA MOLINA**

**FACULTAD DE AGRONOMÍA**



**LA AZIDA DE SODIO APLICADA A LAS SEMILLAS DE SALVIA  
(*Salvia farinacea* Benth. VAR. BLUE BEDDER) PARA CAMBIOS  
GENÉTICOS**

**Presentado por:**

**LUIS JUNIOR SALAS ORDINOLA**

**Tesis para optar por el título de  
INGENIERO AGRÓNOMO**

**Lima - Perú**

**2015**

F30.  
S159  
T

## INDICE GENERAL

	<b>Pág.</b>
<b>I. RESUMEN</b>	1
<b>II. INTRODUCCIÓN</b>	2
<b>III. JUSTIFICACIÓN</b>	4
<b>IV. OBJETIVOS</b>	5
a. OBJETIVO GENERAL	5
b. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	5
<b>V. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b>	6
5.1 MEJORAMIENTO DE CULTIVOS VEGETALES	6
5.2 MUTACIÓN	7
5.3 EFECTO DE LAS MUTACIONES	8
5.4 AGENTE MUTAGÉNICO	9
5.5 AZIDA DE SODIO	10
5.6 SALVIA FARINACEA	15
5.6.1 HISTORIA Y CARACTERÍSTICAS DE <i>S. farinacea</i>	15
5.6.2 PROPAGACIÓN DE <i>S. farinacea</i>	17
5.7 MERCADO ORNAMENTAL EN PERÚ	18
5.7.1 EXPERIENCIAS DE MUTACIONES EN ESPECIES ORNAMENTALES	18
<b>VI. MATERIALES</b>	20
6.1 UBICACIÓN DEL ÁREA EXPERIMENTAL	20
6.2 MATERIAL VEGETATIVO E INSTRUMENTOS	20
6.2.1 MATERIAL VEGETAL	20
6.2.2 MATERIALES Y EQUIPOS	20

4377A

	<b>Pág.-</b>
<b>VII. MÉTODOS</b>	<b>22</b>
7.1 METODOLOGÍA DEL EXPERIMENTO	22
7.1.1 ETAPA INICIAL	22
7.1.2 ETAPA SIMULTÁNEA EN INVERNADERO Y LABORATORIO	23
7.2 VARIABLES A EVALUAR	27
7.2.1 EN LABORATORIO	27
7.2.2 EN INVERNADERO	27
7.3 DISEÑO ESTADÍSTICO	28
7.4 POBLACIÓN Y MUESTRA	28
7.5 HIPÓTESIS	29
<b>VIII. RESULTADOS</b>	<b>30</b>
8.1 RESULTADOS DE ENSAYO EN LABORATORIO	30
8.1.1 PORCENTAJE DE GERMINACIÓN	30
8.1.2 LONGITUD DE RADÍCULA	34
8.2 RESULTADOS EN ENSAYO EN INVERNADERO	37
8.2.1 SOBREVIVENCIA	37
8.2.2 ALTURA DE PLANTA	41
8.2.3 NÚMERO DE VARILLAS FLORALES	45
8.3 OTROS EFECTOS OBSERVADOS	48
<b>IX. DISCUSIÓN</b>	<b>50</b>
9.1 GERMINACIÓN Y TAMAÑO DE RADÍCULA	50
9.2 SOBREVIVENCIA Y TAMAÑO DE PLANTA	51
9.3 VARILLAS FLORALES	53
9.4 EFECTO CONJUNTO DE AZIDA DE SODIO EN PARÁMETROS ESTUDIADOS	54
9.4 AZIDA DE SODIO	55
<b>X. CONCLUSIONES</b>	<b>57</b>

<b>XI. RECOMENDACIONES</b>	<b>58</b>
<b>XII. ANEXOS</b>	<b>59</b>
<b>XIII. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>62</b>

## INDICE DE TABLAS Y GRÁFICOS

	<b>Pág.</b>
• <b>TABLA 1:</b> Análisis de varianza para germinación de semillas (%)	30
• <b>TABLA 2:</b> Prueba DLS de Fisher al 0.05% de probabilidad para porcentaje de germinación	31
• <b>TABLA 3:</b> Porcentaje de germinación de semillas de Salvia sometidas a diferentes dosis de Azida de sodio	31
• <b>TABLA 4:</b> Reducción (%) de la germinación respecto al testigo (C)	32
• <b>TABLA 5:</b> Análisis de varianza para tamaño de radícula de plántulas (medidas en mm)	34
• <b>TABLA 6:</b> Prueba DLS de Fisher al 0.05% de probabilidad para longitud de radícula	35
• <b>TABLA 7:</b> Resultados de la medición de longitud (mm) de radícula	35
• <b>TABLA 8:</b> Reducción (%) de la longitud de radícula respecto al testigo (C)	36
• <b>TABLA 9:</b> Análisis de varianza del número promedio de plantas por maceta	37

•	<b>TABLA 10:</b> Prueba DLS de Fisher al 0.05% de probabilidad para número de plantas por maceta	38
•	<b>TABLA 11:</b> Promedio de plantas por maceta	38
•	<b>TABLA 12:</b> Reducción (%) sobre el número promedio de plantas por maceta respecto del testigo (C)	39
•	<b>TABLA 13:</b> Análisis de varianza para la altura planta (medida en cm)	41
•	<b>TABLA 14 :</b> Prueba DLS de Fisher al 0.05% de probabilidad para altura de planta	42
•	<b>TABLA 15:</b> Altura de plantas (cm) durante tres momentos del experimento	42
•	<b>TABLA 16:</b> Efecto (%) sobre la altura promedio de plantas respecto del testigo (C)	43
•	<b>TABLA 17:</b> Análisis de varianza para el número promedio de varillas florales. Transformación $\sqrt{x+0.5}$ .	45
•	<b>TABLA 18:</b> Prueba DLS de Fisher al 0.05% de probabilidad para promedio de varillas florales. Transformación $\sqrt{x+0.5}$ .	45
•	<b>TABLA 19:</b> Número de varillas florales por tratamiento	46
•	<b>TABLA 20:</b> Cruce de datos correspondientes a sobrevivencia de plantas/maceta y número de plantas/maceta	52
•	<b>TABLA 21:</b> Efecto promedio de cada tratamiento obtenido sobre las semillas de Salvia, en términos porcentuales	54

- **TABLA 22:** Composición de medio de cultivo MS según Murashige and Skoog 61
  
- **GRÁFICO 1:** Distribución del ensayo en el invernadero. (*Control* hace referencia al testigo. *T1, T2, T3, T4*, hacen referencia a los tratamientos con azida de sodio) 25
  
- **GRÁFICO 2:** Distribución del ensayo en el laboratorio. (*Control* hace referencia al testigo. *T1, T2, T3, T4*, hacen referencia a los tratamientos con azida de sodio) 27
  
- **GRÁFICO 3:** Porcentaje de germinación de semillas de Salvia sometidas a diferentes dosis de Azida de sodio 32
  
- **GRÁFICO 4:** Porcentaje de germinación de semillas de Salvia sometidas a diferentes dosis de Azida de sodio 36
  
- **GRÁFICO 5:** Promedio final de plantas por maceta en cada tratamiento 39
  
- **GRÁFICO 6:** Desarrollo de la altura de planta (cm) 44
  
- **GRÁFICO 7:** Número de varillas florales por tratamiento a lo largo del experimento 46
  
- **GRÁFICO 8:** Efecto inhibitorio de azida de sodio sobre diferentes procesos celulares. Traducido de Shu *et al* (2012) 56

## I. RESUMEN

El género *Salvia*, perteneciente a la familia Lamiaceae, es un grupo de plantas que posee múltiples variantes en cuanto a sus características y usos, pasando por el ámbito ornamental y medicinal. Dentro de este género encontramos a la planta *Salvia farinacea* Benth.

El experimento se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología, del Programa de investigación y proyección social en Cereales y Granos Nativos de la Universidad Nacional Agraria la Molina y consistió en comparar las respuestas de las plantas de *Salvia* a los diferentes tratamientos con el agente mutágeno químico azida de sodio.

Se emplearon semillas certificadas de *Salvia farinacea* Benth. var. Blue Bedder. Los tratamientos con azida de sodio que se ensayaron fueron cuatro, con concentraciones de 1mM (T1), 3mM (T2), 5mM (T3) y 7mM (T4). Además se ensayó un tratamiento sólo con solución Buffer y otro Control.

Seiscientas semillas de *Salvia* se emplearon para cada tratamiento. El tiempo que las semillas permanecieron en remojo en la solución de Azida de sodio, o en la solución buffer, fue de una hora. Se evaluaron las variables de porcentaje de germinación, tamaño de radícula, sobrevivencia de plantas, tamaño de planta (Zona aérea) y número de varillas florales.

Para el caso del porcentaje de germinación se observaron diferencias significativas en todos los tratamientos, siendo T3 quien presentó, fuera del control, el porcentaje más alto (75.33). El tratamiento T4, el de mayor concentración, presentó el valor más bajo de porcentaje de germinación (8.67) y el más elevado tanto en tamaño de planta medido en cm. (23.76) como en número de varillas florales (15). En cuanto a la longitud de radículas el único tratamiento que no presentó diferencias significativas respecto al control fue el T3, con una reducción porcentual del tamaño de radícula de 26.37.



## II. INTRODUCCIÓN

El género *Salvia*, perteneciente a la familia Lamiaceae, es un grupo de plantas que posee múltiples variantes en cuanto a sus características y usos, pasando por el ámbito ornamental y medicinal. Dentro de este género encontramos a la planta *Salvia farinacea*, de uso ornamental, cuya zona de origen y desarrollo inicial se describe hacia el hemisferio norte de la región americana, en concreto en el sector del sur estadounidense y norte mexicano.

Aunque el ámbito natural de desarrollo de *Salvia farinacea* se describe hacia Norteamérica existen especies identificadas en zonas sudamericanas, muy bien adaptadas. Su capacidad de crecer a pleno sol (preferentemente) o en ámbitos sombreados, así como su elevada competitividad al desarrollarse junto a otras plantas, hacen de *Salvia farinacea* una especie ornamental de gran atractivo comercial como planta perenne que no requiere excesivos cuidados.

Es importante anotar aquí el colorido y la resistencia (una vez cortadas, si se quiere) de la inflorescencia de salvia, dos caracteres de valoración comercial como planta ornamental. Es acertado, entonces, apuntar hacia los rasgos más atractivos con la intención de potenciarlos y de, eventualmente, desarrollar características novedosas.

Tocaría entonces desarrollar métodos, ya sea a través de selección tradicional o como se planteará más adelante, mediante la inducción a mutaciones, que permitan potenciar el desarrollo y mejoramiento de dichas características.

Es preciso indicar que las mutaciones se entienden hoy en día como una vía que acelera la obtención de cambios que, de una manera espontánea, tardarían demasiado tiempo en aparecer o que en el peor de los casos, y por efectos directamente vinculados al azar, no aparecerían. Y en esta misma línea es correcto aclarar que la práctica científica de inducción a mutaciones en vegetales presenta una gran diversidad de métodos.

Dos son las características principales de la técnica de inducción a mutaciones: la aparición de cambios repentinos (muchas veces apreciables a simple vista) y la aleatoriedad de dichos cambios. Justamente sobre este segundo rasgo es que se encuentra el grueso del trabajo de quien quiera llevar a cabo esta práctica, en la selección de aquellos individuos que presenten modificaciones favorables (según el objetivo que se persiga) sobre algunas características de la planta sin alterar otros rasgos preexistentes e igualmente deseables.

De esta forma la herramienta de la mutación vegetal inducida se presenta como una vía favorable y eficiente, por su inmediatez y efectividad relativa en ocasionar cambios para ser empleada sobre una especie ornamental como es *Salvia farinacea*. Siguiendo en la misma línea es lógico pensar que una planta perenne con mejor capacidad de resistir a épocas secas, mejor capacidad de fijación al suelo, variados colores, mayores y más duraderas inflorescencias; podría ser mucho más atractiva para el consumidor final.

Finalmente, y con lo antes expuesto, queda decir que el presente trabajo busca aprovechar las características propias de *Salvia farinacea* aplicando sobre ella técnicas de mutaciones inducidas para determinar aquellas dosis que permitan obtener cambios favorables que potencien el atractivo comercial de la especie.

### III. JUSTIFICACIÓN

El mercado de plantas ornamentales es un ámbito de gran actividad comercial en nuestro país en el que destacan algunas especies tanto por su durabilidad como por su atractivo. Dentro de este rubro, el comercio de *Salvia farinacea* es reducido (MINAG, 1998) pero de potencial crecimiento precisamente por las características de resistencia, periodo vegetativo relativamente breve y atractivo de la inflorescencia que posee, además de la versatilidad que presenta en usos como flor de corte, arbusto perenne o atrayente de agentes polinizadores (Gilman, 1999); lo que se puede entender como una ventana de oportunidad.

Por otra parte la posibilidad de desarrollar características nuevas mediante inducción de mutaciones, o de acentuar las características deseables ya existentes (tamaño de raíz, periodo de floración, color de inflorescencia, tamaño de planta, etc.), se presenta como un camino muy útil en este deseo de potenciar el cultivo y comercio de salvia.

El empleo de agentes mutagénicos químicos exige el conocimiento sus dosis adecuadas, que permitan, por un lado, la supervivencia de la mayor cantidad de los individuos sometidos al procedimiento de inducción de mutaciones y, de otro lado, que asegure una alta tasa de mutaciones en dichos individuos.

De esta forma es que la principal de las motivaciones del presente trabajo consiste en aproximarse a la determinación del mejor rango de dosificación de azida de sodio sobre las semillas de salvia para obtener cambios genéticos.

## **IV. OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivo general:**

Utilizar azida de sodio para inducir mutaciones en las semillas de Salvia (*Salvia farinacea*) con fines de mejoramiento genético

### **4.2 Objetivos específicos:**

- Determinar la dosis de azida de sodio que induzca cambios genéticos en esta especie.
- Determinar el efecto de la azida de sodio en la germinación de las semillas, tamaño de raíz, supervivencia, altura de planta y número de varillas florales.

## V. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 5.1 MEJORAMIENTO DE CULTIVOS VEGETALES

El mejoramiento vegetal se encuentra presente en el desarrollo de la agricultura prácticamente desde el inicio de esta y así es que las herramientas de este mejoramiento se han desarrollado hasta el día de hoy produciendo la inmensa gama de especies cultivadas que observamos.

Si observamos de cerca la acción de mejoramiento que el ser humano aplica sobre los diferentes cultivos podremos reconocer dos tipos de mejoramiento:

- Una mejora clásica: El hombre se ha valido de cruzamientos, dentro o fuera de las especies, y mutaciones para obtener nuevos grupos vegetales de los que posteriormente seleccionará algunos con características específicas (Benites Burraco, 2005). Por esto se dice que este tipo de mejora se vale tanto de las mutaciones como de las recombinaciones (Fenoll, Gonzáles, 2010) para sus fines. Es importante aclarar que en este proceso de mejoramiento el intercambio o “movilidad” de genes es abundante de tal forma que se obtienen plantas (mutantes o híbridos) donde los genes de las características que se buscan vienen acompañados de muchos otros que no están relacionados, necesariamente, con lo deseado por el mejorador (Covarrubias, 2009).

- Una mejora moderna: En este tipo de mejoramiento se debe aclarar que sólo se incluyen, según diversos autores, aquellas técnicas de biotecnología que actúan sobre características específicas del genoma del cultivos; se refiere también a la práctica de transgénesis llevado a cabo por la ingeniería genética (Castañon, 2002). Aquí se salva el inconveniente presentado por la mejora clásica donde se obtenían individuos que junto con las características (genes) deseadas presentaban muchas otras que incluso podían resultar indeseables.

## 5.2 MUTACIÓN

Anteriormente se ha hablado del mejoramiento vegetal puntualizando sus diferentes características, un punto común, sea cual sea la vía de mejoramiento empleada, es la necesidad de propiciar cambios genéticos en los individuos; cambios que de ser favorables (deseables) se mantengan en el tiempo y, si esto sucede, puedan ser considerados mutaciones.

Una mutación puede ser considerada como un cambio brusco y hereditario en el genotipo de un individuo, dichas mutaciones, además, pueden causar en el genotipo alteraciones que sean minúsculas o imperceptibles (Font Quer, 2001). Esta primera definición es coincidente con la formulada por Heros (1999), según la cual una mutación es el conjunto de cambios que ocurren de manera repentina en el organismo y que tienen la característica de ser heredables. Una mutación, además, puede tratarse de la alteración del ADN en una (o unas pocas) base conocida como mutaciones de punto, o puede darse el caso de pérdidas, adiciones o traslocaciones de grandes porciones de ADN conocidas como mutaciones estructurales (Levitus, *et al*; 2004).

También es importante agregar que las mutaciones son cambios heredables en el material genético no causados por recombinación, entendiendo la recombinación como el cruce de dos moléculas de ADN homólogas que generando una nueva combinación no alteran la estructura de los genes o el número de cromosomas.

Las mutaciones son la puerta de acceso a la diversificación y variabilidad vegetal, una vía que conduce a la perduración en el tiempo; son en definitiva el hilo conductor de la evolución vegetal (y no sólo vegetal). Ya sean naturales o inducidas las mutaciones siempre producirán individuos con rasgos diferenciables, en periodos de tiempo variables, que permitirán una posterior selección y discriminación de acuerdo a lo que el investigador (entiéndase aquí también al agricultor) busque.

Para el fitomejoramiento, especialmente, las mutaciones se configuran como una herramienta invaluable que acelera la posibilidad de “conseguir” individuos con características deseables. Justamente la inducción a mutaciones es una base tan importante en el mejoramiento vegetal hoy en día que, como lo mencionan Broertjes & Van Harten

(1978), se puede observar una larga y creciente lista de productos vegetales mutantes comercializados en diferentes campos (en el caso del rubro ornamental hasta 1977 ya existían 54 especies ornamentales cuyas semillas mutantes se comercializaban)

### **5.3 EFECTO DE LAS MUTACIONES**

Queda claro con lo antes expuesto que una mutación genera cambios. Lo que cabe aclarar es que dichos cambios producidos por las mutaciones pueden ser espontáneos (al tratarse de errores durante la replicación o recombinación del ADN) o inducidos (mediante el uso de agentes mutagénicos) (Koolman, 2004); pero no tiene por qué esperarse que los cambios inducidos sean diferentes a los espontáneos (Heros, 1999). En este sentido encontramos una gran variedad de autores que afirman como Brock (1971) que las mutaciones espontáneas siempre se han dado y son la base, junto a la selección natural, de la variación natural.

Una realidad es que la frecuencia de las mutaciones espontáneas es generalmente baja, por lo que en la actualidad se tiende a emplear agentes mutagénicos para inducir dichos cambios (mutaciones) (Delgado de la Flor, 1970).

Los efectos de las mutaciones, así descritos, aunque se tratan de cambios puntuales no deben ser entendidos como eventos sin mayor trascendencia puesto que se constituyen en el primer paso de muchos de los métodos de mejoramiento actuales.

En el caso particular de inducción a mutaciones con agentes químicos es importante observar el efecto de letalidad sobre el cultivo, de esta forma se asegura que altas concentraciones de mutágeno en el medio de cultivo traen como consecuencia bajos porcentajes de supervivencia, mientras que con menores porcentajes de mutágeno aumenta la supervivencia pero disminuye la probabilidad de encontrar mutantes de valor (García, *et al*; 2010)

## 5.4 AGENTE MUTAGÉNICO

Se denomina de esta forma al componente físico o químico capaz de incrementar significativamente las mutaciones sobre la tasa natural (Jiménez, 1999). Es posible también considerar, aunque se hace con menos frecuencia, agentes mutagénicos biológicos (que actúan mediante efectos químicos y físicos), esto según Font Quer (2001).

Los agentes mutagénicos son de gran importancia en el mejoramiento vegetal pues aumentan la variabilidad genética y las posibilidades de identificar genotipos superiores (García, *et al*; 2010).

Existen una gran cantidad de agentes mutagénicos que se clasifican en dos grandes grupos: mutágenos químicos y mutágenos físicos.

- Los mutagenos físicos consideran a las radiaciones ionizantes (radiación  $\alpha$ , radiaciones  $\beta$ , radiaciones  $\gamma$ , radiaciones por rayos X) que producen radicales libres en las células, es decir, moléculas con electrones no apareados que son sumamente reactivas y que pueden alterar el ADN (Koolman, 2004)

- Los mutágenos químicos, según (Oliva, 2004), pueden reconocerse como alquilantes, que transfieren grupos metilo o etilo a las bases nitrogenadas que entonces no podrán aparearse normalmente con sus bases complementarias, generando mutaciones; o como intercalantes que son agentes que se intercalan entre las bases nitrogenadas alterando la estructura del ADN.

En una clasificación diferente Pabón (2011) menciona que también se pueden presentar otros tres grupos de agentes mutagénicos: 1) análogos de base, que se incorporan al ADN durante la replicación y pueden generar una copia errónea de bases nitrogenadas; 2) agentes que reaccionan sobre el ADN cuando no se está replicando, alterando químicamente las bases y posteriormente ocasionando un apareamiento incorrecto; 3) ácido nitroso e hidroxilamina, que modifican las bases nitrogenadas adenina y citosina produciendo transiciones.



Azida de sodio, se encuentra dentro del grupo de los agentes mutagénicos químicos, pero con características que la hacen particular. Este compuesto químico es considerado de gran eficiencia para inducir mutaciones.

Para el uso de agentes mutagénicos (de naturaleza química) se deberá tener en cuenta lo siguiente (Van Harlen 1998):

- La dosis y cantidad del mutágeno en relación con el número y tamaño del objeto tratado
- pH
- Propiedades físicas y químicas del mutágeno
- Interacción con el medio de cultivo (en caso de que se trate de un tratamiento *in vitro*)
- Interacción con (refiriéndose al modo de penetración) tejidos vegetales específicos
- Condiciones de post-tratamiento

## 5.5 AZIDA DE SODIO

La azida de sodio es un preservante común para reactivos de laboratorios y es ampliamente usada en la industria de explosivos. Uno de los usos más comunes de este compuesto es en los airbags (bolsas de aire) que usan como mecanismo de seguridad los vehículos. A pesar de este uso cotidiano la azida de sodio presenta gran toxicidad pudiendo ser ingerida inhalada o absorbida a través de la piel (Sullivan & Krieger, 2001).

La azida de sodio,  $N_3Na$ , se presenta como cristales de color blanco con una densidad de  $1.850 \text{ g/cm}^3$ , pudiendo ser explosivo a una temperatura de  $275^\circ\text{C}$  (The Sarpong Group, University of California)

Según Heros (1999) la azida de sodio ( $NaN_3$ ), o azida sódica, es un efectivo agente mutagénico del que es posible obtener una alta frecuencia de mutaciones con menor frecuencia de aberraciones cromosómicas. Estas características hacen de la azida de sodio no sólo un agente mutagénico efectivo sino también, y sobre todo, eficiente. Van Harlen

(1998) hace la misma referencia sobre la eficiencia de la azida de sodio cuando menciona que este agente ocasiona, aparentemente, sólo mutaciones de punto con mínimas deleciones en un locus.

Kleinhofs (1974) señala que la azida en soluciones ácidas es muy efectiva en la inducción a mutaciones clorofilicas y morfológicas (en pruebas en cebada) mientras que en soluciones alcalinas no es efectiva.

Por otro lado, la azida sódica no es en sí misma un agente causante de mutaciones pues requiere de la ruta de síntesis de la L-cisteína para transformarse en azido-alanina. Esta última forma química es la que corresponde al metabolito responsable de la inducción de mutaciones. El efecto puntual de mutación que puede generar la azida de sodio en la secuencia de ADN es el de sustituir bases nitrogenadas: Guanina/Citosina o Adenina/Timina. (Levitus, *et al*; 2004).

Menciona Chávez-Tafur (1991) como otras características apreciables de este agente que la azida de sodio es un mutágeno fácil de manejar, no persistente y barato.

Existen numerosas experiencias de inducción a mutaciones en cultivos comerciales con azida de sodio, a continuación mencionamos algunas de ellas:

- Sander y Muehlbauer (1977) comparan el efecto de la azida de sodio y la radiación gamma sobre semillas del género *Pisum*. Emplean una concentración de 0.001 M (en un medio de pH 3) del agente químico comparada con radiaciones de 5, 10 y 20kR de rayos gamma. En los resultados se observaron aberraciones en la hojas de las plantas sometidas a radiación y no así en las tratadas con azida de sodio. Se determinó que la azida de sodio no causaba daño a nivel de cromosomas con esta dosis.

- Dentro de los resultados obtenidos por Jiménez (1999) al desarrollar líneas mutantes de cebada, se menciona que el efecto de los agentes mutagénicos en bajas concentraciones, cuando se aplican en conjunto dos agentes como azida y metil-nitroso-úrea (MNH), provoca mutaciones puntuales favorables.

- Por otro lado, trabajando sólo con el agente químico azida de sodio, Chávez-Tafur (1991) menciona que obtuvo un 60% de eficacia (obtención de mutantes viables) de la mutagénesis inducida en cebada (poco menos de lo obtenido con rayos gamma en el mismo ensayo:65%).

- Se tiene la experiencia de inducción a mutaciones en el cultivo de arroz realizada por Mohana y Reddi (1986) con concentraciones de 1, 2, 4 y 5 mM de azida de sodio a un pH de 3 a 4. Se emplearon tres diferentes cultivares de arroz, Jaya, IET 5656 y Fujiminori, donde (en todos ellos) la concentración de 5mM fue la más efectiva al inducir mutaciones morfológicas. Se señala además que las mutaciones morfológicas y fisiológicas aisladas incluyeron plantas altas, semienanas, enanas, temprana y tardía floración, riqueza proteica, entre otras muchas.

- Nodarse, *et al* en 1992 realizaron ensayos buscando obtener subclones resistentes a la roya (*Puccinia melanocephala* H y P Sydow), para tal fin se empleó caña de azúcar de la variedad susceptible C127-78. Se indujo la formación de cayos in-vitro (medio de cultivo Payan y Tarcón). Los cayos obtenidos fueron sometidos a diferentes mutágenos: a) Rayos X. 80; 100; 110 y 120 Kv. b) Rayos Gamma.1000; 2000 y 3000 rad. c) Azida Sódica. 0,01; 0,02; 0,03; 0,04; 0,05 y 0, 1 %. Finalmente sólo los subclones obtenidos de aquellos cayos tratados con 80Kv de rayos X presentaron resistencia a roya, los demás mantenían la susceptibilidad.

- En 2010 García *et al*, emplearon diferentes dosis de azida de sodio (2.0mM, 1.0mM y 0.5mM) para determinar su efecto en la germinación las semillas de tres variedades comerciales de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd) (“Rosada de Huancayo”, “Blanca de Hualhuas” y “La Molina 89”). Se obtuvieron variaciones favorables y se determinó la dosis adecuada de mutagénico que las puede causar.

- Adamu y Aliyu (2007) trabajaron con semillas de tomate (*Lycopersicon sculentum* Mill) de las variedades T106, T244 y T420 obtenidas del Instituto de investigación agrícola Ahmadu Bello University Zaria de Nigeria. Sometieron a dichas semillas a concentraciones de 1.0, 2.0 y 4.0 mM de azida de sodio midiendo posteriormente sus efectos en la germinación de semillas, sobrevivencia de semillas, peso de semillas, tamaño de raíz, número de hojas por planta, peso en la planta madura y número de frutos por planta. Se determinó, finalmente, que la concentración de 4.0 mM fue la más efectiva.

- En 2011, Mostafa, trabajando con semillas de *Helianthus annuus* L. probó las concentraciones de azida de sodio de 1.54, 3.08, 4.62, 6.15 y 7.69 mM para observar el efecto en el crecimiento y la variabilidad. Se emplearon los cultivares Giza 1 y Giza 102. Las semillas se remojaron en las concentraciones antes mencionadas del agente mutagénico por un lapso de 4 horas (se menciona que con un remojo de 24 horas no se pudo obtener germinación alguna). Se detalla que en el cultivar Giza 1 los porcentajes de germinación de semillas decrecieron considerablemente con todos los tratamientos, mientras que el cultivar Giza 102 tratado con 1.54 mM de azida de sodio no presenta diferencias significativas con la germinación del control, similar caso es el que se menciona al trabajar con 3.08 mM del mutágeno y con las concentraciones superiores se vieron caídas significativas de los porcentajes de germinación.

- En un estudio realizado por Al-Qurainy (2009) con *Eruca sativa* L. se trataron las semillas de esta planta con concentraciones de 1 a 5 mM de azida de sodio. La concentración correspondiente a 3mM fue la que presentó la más alta efectividad en todas las mediciones morfológicas y de rendimiento. Además se apunta en este mismo trabajo que con concentraciones de 5mM se obtuvieron bajos contenidos de clorofila.

- Ali *et al* (2014) evaluaron los efectos de la azida de sodio sobre las semillas de *Lens culinaris* M. Se emplearon dos variedades de lentejas (L4594 y L4147) que se sometieron a diferentes dosis de azida de sodio. En la variedad L4147 no hubo sobrevivencia de plántulas, bajo ningún tratamiento, después del día 25 en condiciones de

campo; además se determinó que la dosis de 0.1% de azida de sodio en esta variedad incrementó significativamente el número de brotes y de vainas por planta.

- Sobre *Stevia rebaudiana* hacen un interesante estudio Pande y Khetmalas (2012). En dicho estudio se trata de observar el efecto de soluciones de azida de sodio y de colchicina sobre la germinación de semillas de *Stevia rebaudiana* y sobre la inducción de callos de este mismo cultivo. Se aplicaron diferentes dosis de ambos agentes mutagénicos que variaron entre 0-0.250% por periodos de tiempo también variados. Tanto el aumento de la concentración de azida de sodio y colchicina como el aumento del tiempo en que se expusieron las semillas a estos agentes causaron un decrecimiento en la germinación y en el porcentaje de inducción de callos. Finalmente los autores indican que una concentración de 0.05% de azida de sodio y colchicina por un periodo de 12 horas muestran un 63.3% y 60% de germinación respectivamente, en el mismo orden se presenta un 26.85% y un 43.3% de sobrevivencia de plántulas respectivamente.

- Es particularmente interesante anotar los resultados obtenidos por Mirzaei et al (2013) al estudiar el potencial antimutagénico de 4 plantas medicinales iraníes dentro de las cuales tres pertenecen, al igual que *Salvia farinacea*, a la familia Lamiaceae: *Teucrium polium*, *Origanum vulgare* y *Menthe piperita*. Estas fueron sometidas al test de Ames empleando cepas de la bacteria *Salmonella typhimurii*. Los resultados determinaron una actividad antimutagénica de 36.5%, 28.8% y 54.2% producto de los extractos de *Teucrium polium*, *Origanum vulgare* y *Menthe piperita*, respectivamente.

- En la misma línea Tajehmiri et al (2014) realizaron un ensayo con romero, *Rosmarinus officinalis* L., de la familia lamiaceae. Se realizó un extracto de las hojas de romero para probar su actividad antimutagénica frente a la azida de sodio aplicando el test de Ames. En una solución final de 3ml se mezclaron 0.5ml de extracto de hojas de romero, 0.1ml de *S. typhimurium* TA100, 0.1ml de azida de sodio, 0.1ml de histidina y 0.5mM de biotina y agar. Los resultados mostraron que el romero puede inhibir la actividad mutagénica de la azida de sodio en un 42.92%.

## 5.6 *Salvia farinacea*

Esta planta de la familia Lamiaceae presenta la siguiente clasificación taxonómica según el Sistema de Información de Taxonomía Integrada (ITIS 2014):

<i>Reino</i>	<i>Plantae</i>
<i>Subreino</i>	<i>Viridaeplantae</i>
<i>Infrareino</i>	<i>Streptophyta</i>
<i>División</i>	<i>Tracheophyta</i>
<i>Subdivisión</i>	<i>Spermatophytina</i>
<i>Infradivisión</i>	<i>Angiospermae</i>
<i>Clase</i>	<i>Magnoliopsida</i>
<i>Superorden</i>	<i>Asteranae</i>
<i>Orden</i>	<i>Lamiales</i>
<i>Familia</i>	<i>Lamiaceae</i>
<i>Genero</i>	<i>Salvia</i> L.
<i>Especie</i>	<i>Salvia farinacea</i> Benth

### 5.6.1 HISTORIA Y CARACTERÍSTICAS DE *Salvia farinacea*

El género *Salvia* es el más numeroso de la familia de las Lamiaceas, con una especialmente superior extensión en territorio americano. En este sentido, si nos ubicamos en la zona sudamericana podemos reconocer también la gran diversidad de este género, que alcanza a zonas colombianas, peruanas y ecuatorianas, donde se han reconocido hasta 206 taxones.

En términos globales podremos decir que la planta ornamental de salvia (*Salvia farinacea*) encuentra una de sus primeras referencias hacia el siglo XVIII en Inglaterra donde, según Guillot (2009), era comúnmente cultivada en los jardines. El lugar de origen

de *Salvia farinacea* es México y parte de la zona estadounidense incluyendo Texas (Ryan 2002; Seedaholic, 2014).

La denominación de *Salvia* hace referencia a las propiedades curativas que poseen muchas de los géneros de este grupo (*Salvus*, del latín “salud”), mientras que *farinacea* se podría traducir literalmente como “harinoso” y quizá hacer referencia a la textura que adquiere esta planta en la superficie de sus tallos.

La importancia ornamental de esta planta radica en su inflorescencia del tipo espiga donde luce flores labiadas de colores variados, características que la convierten en este tiempo en una especie ornamental usada como cerco perenne o como flor de corte (debido a su durabilidad).

El género *Salvia* es el más extenso de la familia, con alrededor de 935 especies reconocidas y con una diversidad considerable en países como Perú, Colombia o Ecuador donde se observan 80 taxones en promedio (Fernández, 2006).

Presenta plantas anuales o perennes, también arbustivas (muy rara vez árboles). La especie de *Salvia farinacea* Benth. presenta plantas con una altura entre 0.5m y 0.8m.

Los tallos son generalmente cuadrangulares, con densa ramificación y de textura “harinosa”

Las hojas opuestas, simples y ovalo-lanceoladas presentan comportamiento caducifolio y un color verde que varía de acuerdo al cultivar. El borde presenta una característica dentada o aserrada.

La inflorescencia es de tipo espiga que puede ser terminal o lateral, con flores de cáliz bilabiado con cinco piezas parcialmente soldadas; los pétalos poseen una parte tubular y otra “abierta” con cinco lóbulos parcialmente soldados (característica propia de las *Lamiaceae*). El labio superior en forma de “casco” provee de protección a los estambres mientras que el inferior trilobado, un poco más inclinado hacia abajo, ejerce como plataforma para los agentes polinizadores (Fernández, 2006).

Posee estambres en número siempre menor a cinco (usualmente uno o dos pares) con los filamentos articulados en su extremo. En cuanto al gineceo el ovario posee dos carpelos aunque con dos tabiques debido al estilo conectado al ovario por su base.

Los frutos formados son secos e indehiscentes con cuatro unidades, del tipo tetranúcula (Guillot, 2009; Torres 2010).

### **5.6.2 PROPAGACIÓN DE SALVIA**

Se pueden observar dos tipos de propagación:

a. Propagación por semilla:

La propagación de *Salvia farinacea* Benth. por semilla es de germinación fácil siempre que se tenga un sustrato con buen drenaje. La germinación de las semillas concluye entre la segunda y la tercera semana siempre que cuente con una temperatura apropiada alrededor de los 20°C (Guillot, 2009) por lo que es una especie que se considera de climas cálidos.

b. Propagación vegetativa

Para propagación vegetativa de *Salvia* se suele recurrir a división de matas, acodos o esquejes semi-maduros; buscando que se trate de la época temprana de otoño. Una característica de la *Salvia* a tener en cuenta es su aptitud para enraizar con relativa facilidad por lo que no precisa de insumos adicionales.

Mediante de este tipo de propagación se obtienen vástagos idénticos a la planta madre de la cual se ha extraído el material de multiplicación (Coronado, 2006). Aunque es una vía de multiplicación menos empleada resulta efectiva (Infojardin, 2014).



## **5.7 MERCADO ORNAMENTAL EN PERÚ**

Al hablarse de *Salvia farinacea*, una planta ornamental, se deberá también hacer referencia a la situación del mercado ornamental del país. Y en este punto es una realidad que, tomando como base los datos proporcionados por el Ministerio de Agricultura (MINAG), la producción mayoritaria de flores se refiere a otras especies: gladiolo (23.5%), crisantemo (13.5%) y clavel (12.6%), todas flores de corte, en los primeros lugares en cuanto a áreas sembradas con plantas ornamentales (MINAG, 1998).

Dentro de este panorama el cultivo de *Salvia* se encuentra relegado. Es justamente esta realidad la que propone una ventana de alternativas comerciales para este cultivo, siendo necesario que se resalten (y este documento pretende mostrar el trabajo a nivel de cambios genéticos) las características apreciadas en esta especie como resistencia a altas temperaturas, el ser un agente polinizador o su atractivo a nivel de inflorescencia.

### **5.7.1 EXPERIENCIAS DE MUTACIONES EN ESPECIES ORNAMENTALES**

Dentro de las experiencias de inducción de mutaciones en cultivos comerciales de plantas ornamentales se encuentran numerosas experiencias. A continuación se mencionan sólo algunas de las más actuales, que pretenden reflejar los avances obtenidos mediante esta técnica de mejoramiento:

- En ensayos realizados con crisantemos (*Dendranthema grandiflora*) para obtener mutaciones en el color de flor utilizando rayos gamma se determinó que dosis cercanas a 1Krad son benéficas en cuanto propician mutaciones a nivel de flor sin causar elevadas tasas de mortalidad (Otaola, *et al*; 2001)

- En 2010, Kumar y Ratnam evaluaron el efecto, en cuanto a inducción de mutaciones, de los rayos gamma y la azida de sodio en semillas de girasol de dos variedades: USH-430 y SHSF-333. Se evaluó la germinación, la sobrevivencia, la fertilidad del polen y la cantidad de semillas por inflorescencia (capítulo). Los resultados presentados

mostraban que conforme se aumentaba la dosis de cada agente mutagénico aumentaba también la letalidad y el porcentaje de esterilidad. Así mismo se observó que para la variedad USH-430 una dosis de 6kR (rayos gamma) en combinación con 6mM (azida de sodio) aumentaron significativamente el porcentaje de cantidad de semillas por capítulo.

- En un ensayo realizado sobre *Browallia speciosa* (familia solanácea) por El-Mokadem y Mostafa (2013) se indujo mutaciones con diferentes dosis de azida de sodio. Se probaron dosis de 0, 3.08, 6.15, 9.23 y 12.31 mM, que se aplicaron mediante aspersion al suelo. En todos los tratamientos se observaron aumento de ramas y hojas, aumento del contenido de clorofila y aumento del peso fresco de raíces. Todas las concentraciones de azida, además, produjeron cambios en el color de flor, forma de flor y forma de hoja; esto en las dos generaciones estudiadas. Finalmente indican que el tratamiento con 12.31mM fue el más genéticamente distinto seguido del tratamiento donde se aplicaron 9.23mM de azida de sodio.

## **VI. MATERIALES**

### **6.1 UBICACIÓN DEL ÁREA EXPERIMENTAL**

La presente experimentación se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología, del Programa de investigación y proyección social en Cereales y Granos Nativos de la Universidad Nacional Agraria la Molina, ubicada en el Departamento de Lima, provincia de Lima, localizada a  $76^{\circ}56'37.41''$ (O) y  $12^{\circ}4'40.22''$ (S), a una altitud de 245msnm.

### **6.2 MATERIAL VEGETATIVO E INSTRUMENTOS**

#### **6.2.1 MATERIAL VEGETAL:**

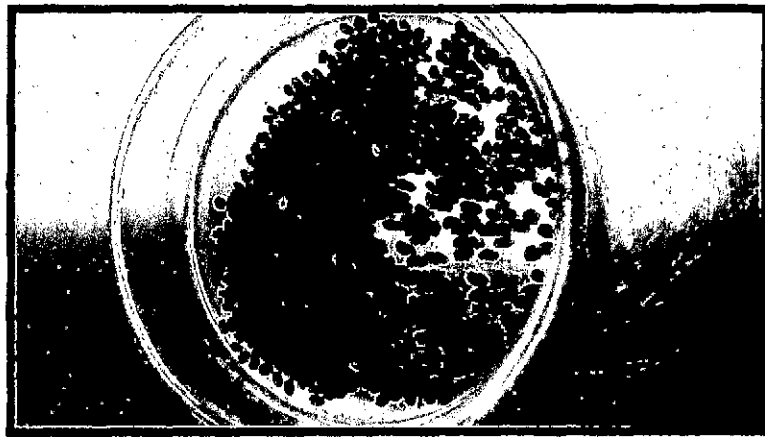
- El material vegetal consistió de semillas certificadas de *Salvia farinacea* Benth var. Blue Bedder. Importada por IncaForest.

#### **6.2.2 MATERIALES Y EQUIPOS:**

- Cámara de flujo laminar
- Autoclave
- Estufa
- Balanza analítica
- Potenciómetro
- Agua destilada
- Placas Petri
- Frascos de vidrio, vasos plástico transparentes, matraz y botellas de vidrio de un 1L
- Probetas, bandejas, pinzas, micropipetas, bisturí y tijeras
- Mechero, papel toalla y mascarilla

- Sustrato (Premix)
- Cámara fotográfica
- Reactivos químicos:
- Macronutrientes y Micronutrientes del medio de cultivo MS
- Solución buffer (ácido ortofosfórico y fosfato de potasio) pH 3
- Azida de sodio.

Imagen1: Semillas de *Salvia farinacea* Benth var. Blue Bedder.



## **VII. MÉTODOS**

### **7.1 METODOLOGÍA DEL EXPERIMENTO**

El experimento se llevó a cabo en tres etapas: una primera etapa inicial donde se trabajó con todo el material vegetal y dos etapas posteriores que se desarrollaron en simultáneo en laboratorio e invernadero con igual cantidad de material vegetal.

#### **7.1.1 ETAPA INICIAL**

En una etapa previa se realizó el siguiente procedimiento (antes de dividir el material en los dos ambientes mencionados):

a. Desinfección de semillas: Se procedió a desinfectar el total de semillas (tres mil seiscientas semillas) con una solución al 25% de hipoclorito de sodio por 10 minutos para luego realizar un triple enjuague en agua destilada.

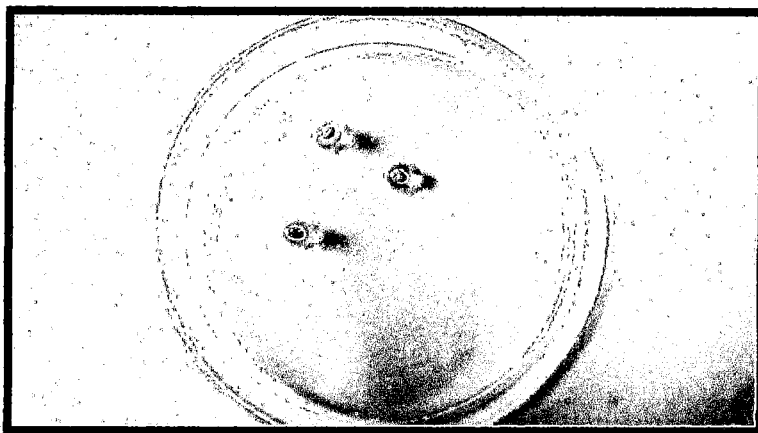
b. Se aplicaron diferentes dosis de Azida de sodio sobre las semillas de Salvia: Se llevaron a cabo cuatro tratamientos con concentraciones de 1mM, 3mM, 5mM y 7mM.

Además se ensayó un tratamiento sólo con solución Buffer y otro Control. Seiscientas semillas de Salvia se emplearon por cada tratamiento.

El tiempo que las semillas permanecieron en remojo en la solución de Azida de sodio, o en la solución buffer, fue de una hora.

Los procedimientos detallados de preparación de cada uno de los tratamientos se adjuntan en el Anexo #1

Imagen 2: Semillas de *Salvia farinacea* Benth var. Blue Bedder. Luego de una hora de remojo en agua destilada



### 7.1.2 ETAPA SIMULTÁNEA EN INVERNADERO Y LABORATORIO

A continuación se detalla el procedimiento seguido en cada una de las secciones, invernadero o laboratorio, en que se llevó a cabo esta experimentación.

- **En Invernadero**

Se llevaron a cabo los siguientes procedimientos:

a. Un total de mil ochocientas semillas de *Salvia* sometidas previamente a remojo en diferentes dosis de solución de azida de sodio (además de la solución buffer y el control) fueron sembradas en macetas (veinticinco semillas por cada maceta) y acondicionadas en un invernadero del Programa de Cereales y Granos Nativos de la Universidad Nacional Agraria la Molina.

Se distribuyeron 12 repeticiones por cada tratamiento (incluidos el tratamiento con solución buffer y el control) por lo que finalmente se tuvieron 72 macetas (Gráfico 1)

b. Se llevaron a cabo evaluaciones semanales de las variables que posteriormente se detallarán

c. Se fertilizaron cada una de las repeticiones (cada una de las macetas) con medio de cultivo MS, Murashige and Skoog, (Anexo2) sin vitaminas ni reguladores de crecimiento. La dosis fue de 13.9ml por repetición. En la composición del medio de cultivo además, no se incluyeron azúcar ni agentes gelatinizantes.

Imagen 3: Distribución en invernadero de las 72 macetas con 25 semillas de Salvia cada una.

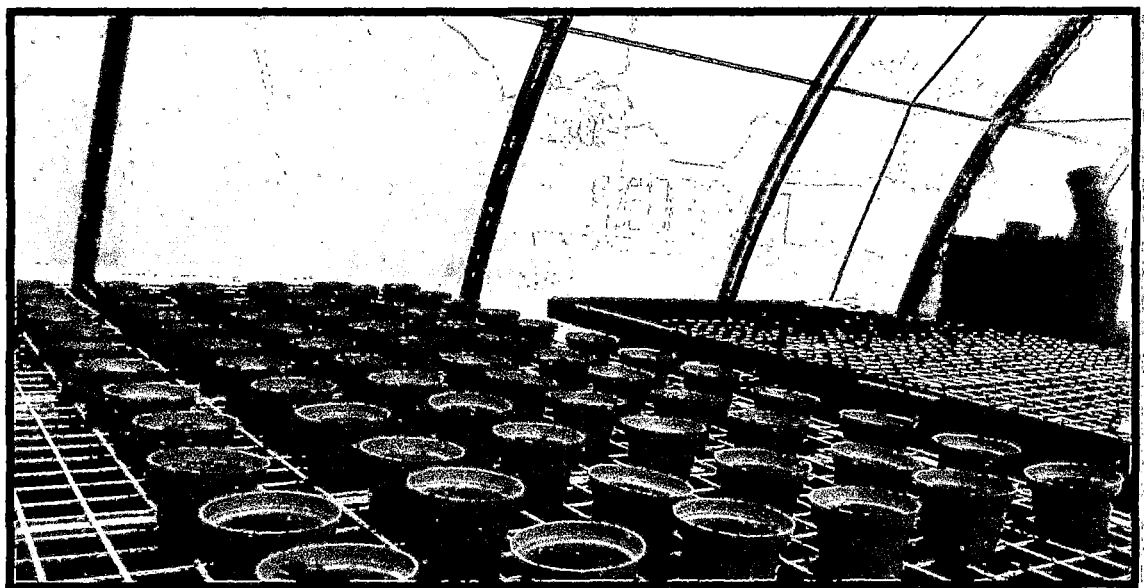
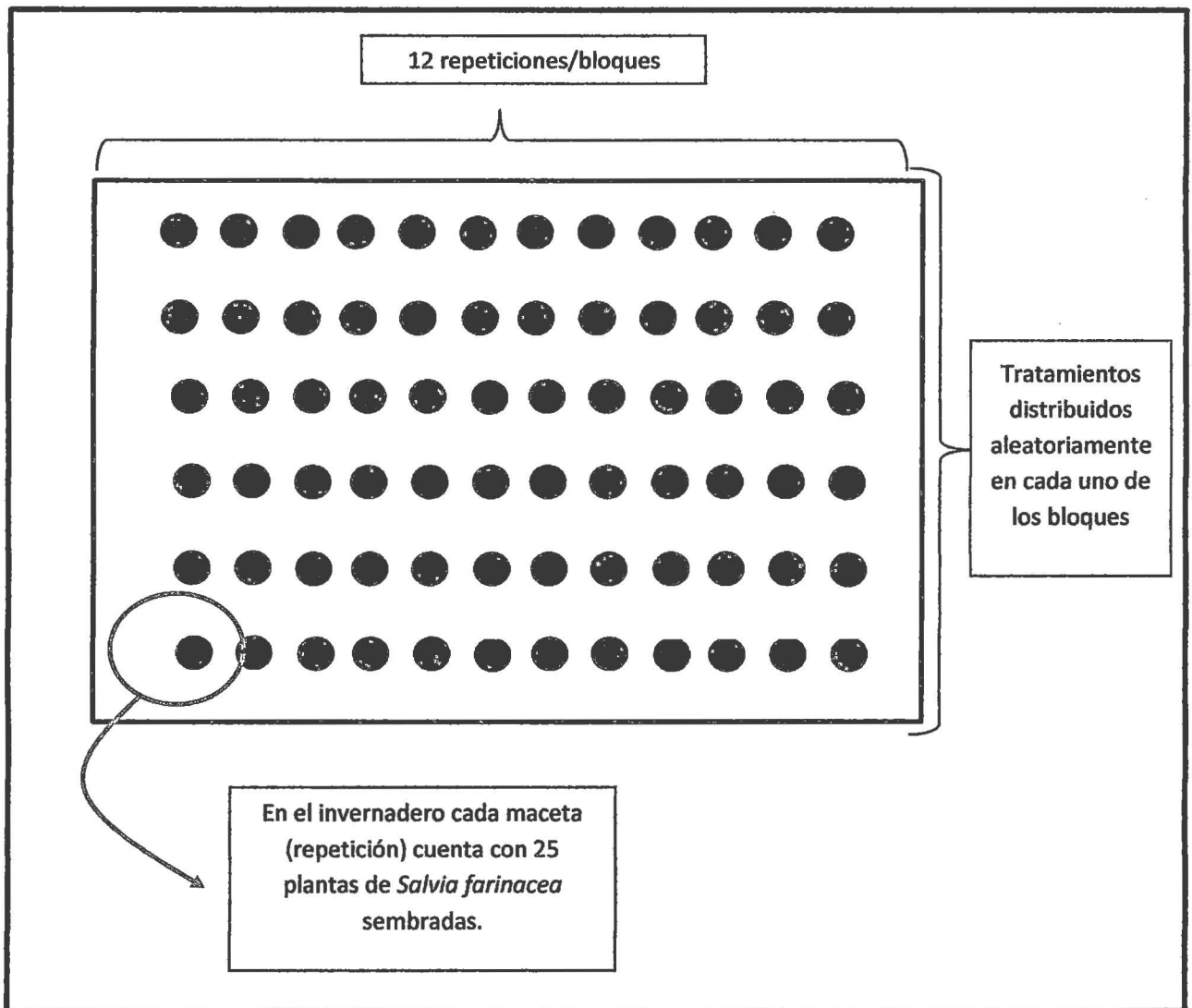


Gráfico 1: Distribución del ensayo en el invernadero. (*Control* hace referencia al testigo. *T1, T2, T3, T4*, hacen referencia a los tratamientos con azida de sodio)



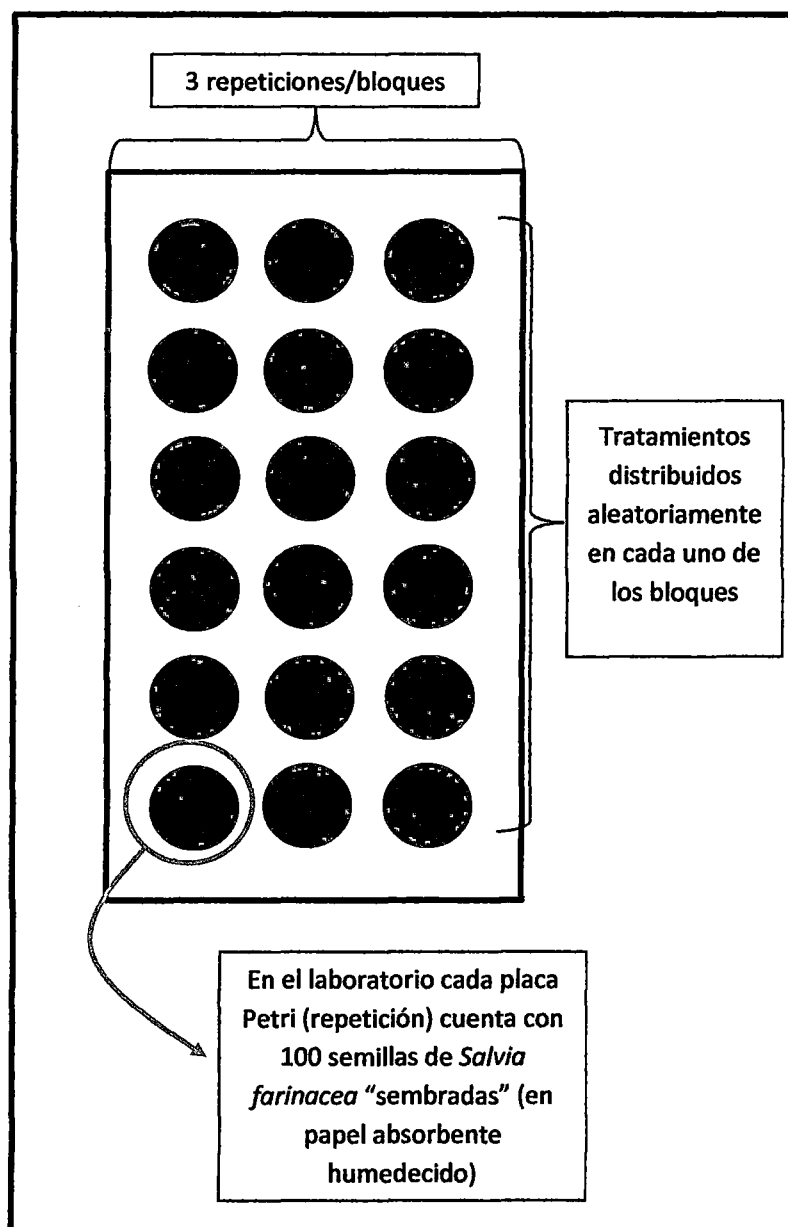


- **En Laboratorio**

a. Se utilizaron de mil ochocientas semillas de Salvia, se sometieron previamente a remojo en diferentes dosis de solución de azida de sodio (además de la solución buffer y el control) y fueron sembradas en placas Petri (cien semillas por placa) sobre papel absorbente humedecido con agua destilada y cubiertas con una capa adicional de papel absorbente humedecido. Fueron acondicionadas en el Laboratorio de Haploides, del Programa de Cereales y Granos Nativos de la Universidad Nacional Agraria la Molina, bajo condiciones controladas (16 horas de luz y 8 horas de oscuridad; 24°C). Existieron tres repeticiones (placas Petri) por cada tratamiento. (Gráfico 2). Todo el procedimiento se llevó a cabo en un ambiente inocuo y con instrumentos previamente esterilizados.

b. Se llevaron a cabo evaluaciones semanales (durante las dos primeras semanas desde la instalación del experimento) de las variables que posteriormente se detallarán.

Gráfico 2: Distribución del ensayo en el laboratorio. (*Control* hace referencia al testigo. *T1*, *T2*, *T3*, *T4*, hacen referencia a los tratamientos con azida de sodio)



## **7.2 VARIABLES A EVALUAR**

Se llevaron a cabo evaluaciones, en ambas secciones, sobre las siguientes variables

### **7.2.1 EN LABORATORIO**

- **Porcentaje de germinación:** Se calculó mediante un conteo simple de semillas que muestren epicotilo y/o radícula durante los primeros 10 días
- **Tamaño de radícula:** Se calculó mediante la medición (en cm.) de las radículas en semillas germinadas durante los primeros 14 días.

### **7.2.2 EN INVERNADERO**

- **Porcentaje de emergencia:** Se calculó en base a un conteo simple de aparición de cotiledones (abiertos o no) sobre la superficie del sustrato.
- **Tamaño de planta (Zona aérea):** Mediante la medición de la altura de planta (por maceta)
- **Número de varillas florales:** Se realizó un conteo de las varillas florales por tratamiento, se tomó en cuenta también el número de días desde el día de siembra (DDS).

### 7.3 DISEÑO ESTADÍSTICO

El diseño experimental que se empleó (tanto en el ensayo de laboratorio como en el de invernadero) fue un Diseño de Bloques Completos al Azar (DBCA).

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \beta_j + \varepsilon_{ij} \quad \begin{array}{l} i=1,2,\dots,t \text{ (Número de tratamientos)} \\ j=1,2,\dots,r \text{ (Número de bloques)} \end{array}$$

Donde:

$\mu$  = Parámetro, efecto medio

$\tau_i$  = Parámetro, efecto del tratamiento  $i$

$\beta_j$  = Parámetro, efecto del bloque  $j$

$\varepsilon_{ij}$  = valor aleatorio, error experimental de la u.e.  $i,j$

$Y_{ij}$  = Observación en la unidad experimental

- **En Laboratorio:** Se desarrolló un diseño con tres (3) bloques
- **En Invernadero:** Se desarrolló un diseño con doce (12) bloques

### 7.4 POBLACIÓN Y MUESTRA

La muestra está compuesta por 3600 semillas (divididas en partes iguales para el ensayo en laboratorio e invernadero) de *Salvia farinacea* var. Blue Bedder, del productor francés Bertrand y distribuidas por Incaforest.

## VIII. RESULTADOS

Para todos los resultados que a continuación se presentan se hará referencia a las siguientes siglas:

C: Tratamiento control/testigo

T2: Tratamiento 2 (3mM)

T0: Buffer (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) pH:3

T3: Tratamiento 3 (5mM)

T1: Tratamiento 1 (1mM)

T4: Tratamiento 4 (7mM)

### 8.1 RESULTADOS DE ENSAYO EN LABORATORIO

#### 8.1.1 PORCENTAJE DE GERMINACIÓN

En la tabla 1 se presenta el análisis de varianza que determina la diferencia significativa de la germinación entre los diferentes tratamientos.

Tabla 1: Análisis de varianza para germinación de semillas (%)

Fuente de variación	GL	SC	CM	F VAL
Tratamiento	5	11351.61	2270	69.38*
Bloque	2	88.11	44.06	
Error	10	327.22	32.72	
Total	17	11766.94		

$\alpha = 0.05\%$  Coeficiente de variabilidad (CV) = 9.1%

La tabla 2 muestra los promedios finales (en términos porcentuales) de germinación. Según la prueba DLS de Fisher existen diferencias significativas en todos los tratamientos respecto del testigo.

Se puede observar en este punto el efecto letal que ocasiona el uso de azida de sodio en la germinación de las semillas a medida que se incrementa su dosis en referencia al testigo.

Tabla 2: Prueba DLS de Fisher al 0.05% de probabilidad para porcentaje de germinación

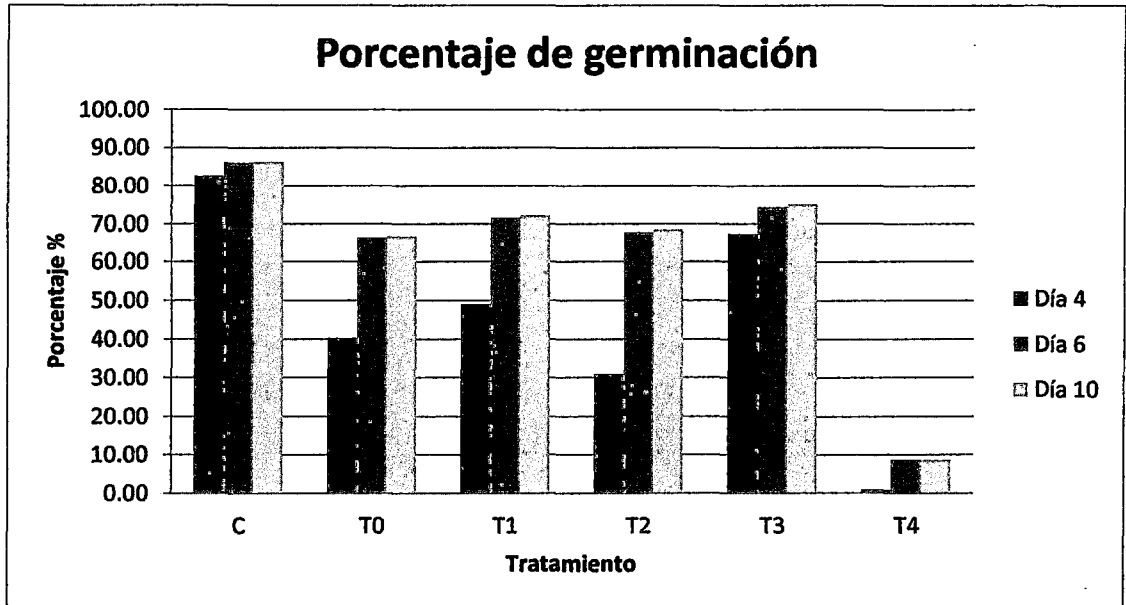
Tratamiento comparado con el Testigo	Promedio de germinación (%)	Significación
T0	67.00	**
T1	72.33	*
T2	68.67	**
T3	75.33	*
T4	8.67	**

A continuación se muestran los resultados de la evaluación de la germinación en términos porcentuales (Tabla 3), además se presenta un gráfico (Gráfico 3) donde se observa el desarrollo de la germinación en los diez primeros días después de la siembra.

Tabla 3: Porcentaje de germinación de semillas de Salvia sometidas a diferentes dosis de Azida de sodio

Día después de la siembra	Germinación de semillas (%)					
	C	T0	T1	T2	T3	T4
Día 4	82.67	40.33	49.00	31.00	67.67	1.00
Día 6	86.00	66.67	71.67	68.00	74.67	8.67
Día 10	86.33	67.00	72.33	68.67	75.33	8.67

Gráfico 3: Porcentaje de germinación de semillas de Salvia sometidas a diferentes dosis de Azida de sodio



Todos los tratamientos generaron una reducción en el porcentaje de germinación de las semillas de Salvia respecto al tratamiento testigo (C), tal como se muestra en la tabla 4.

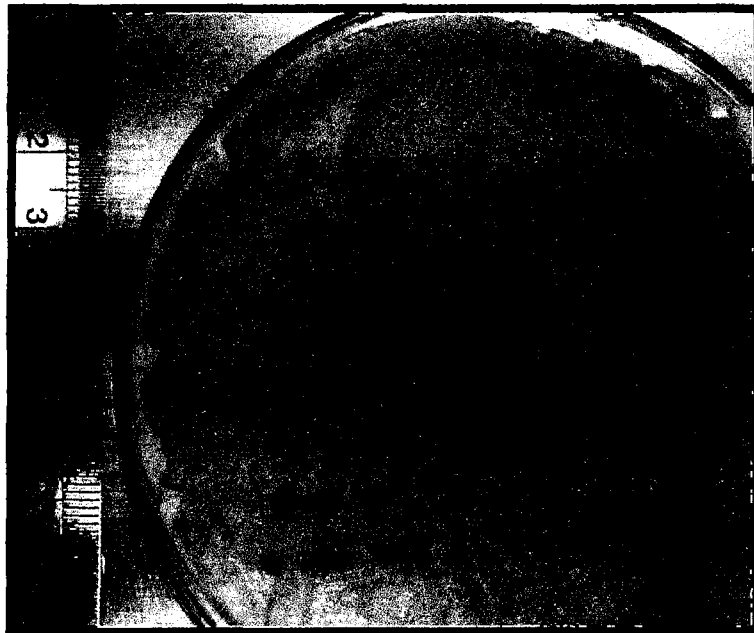
Tabla 4: Reducción (%) de la germinación respecto al testigo (C)

Tratamiento	Reducción en la germinación (%)
C	0.00 (Base)
T0	22.39
T1	16.22
T2	20.46
T3	12.74
T4	89.96

Imagen 4: Prueba de germinación. Control, primera evaluación



Imagen 5: Prueba de germinación. T4 (7mM), primera evaluación





### 8.1.2 LONGITUD DE RADÍCULA

En la tabla 5 se presenta el análisis de varianza que determina la diferencia significativa en referencia al tamaño de radícula entre los diferentes tratamientos.

Así mismo en la tabla 6 se muestran los promedios finales (mm) de longitud de radícula. Según la prueba DLS de Fisher existen diferencias significativas tres de los tratamientos respecto del testigo.

El tratamiento 3 es el único que originó una longitud similar al tratamiento testigo mientras que las demás dosis causaron, en todos los casos, reducción del tamaño radicular.

En ambos análisis estadísticos se puede notar el efecto que ocasiona la azida de sodio en el tamaño de radícula a medida que se incrementa la dosis comparada con el testigo.

Tabla 5: Análisis de varianza para tamaño de radícula de plántulas (medidas en mm)

Fuente de variación	GL	SC	CM	F VAL
Tratamiento	5	68.35	13.67	5.58*
Bloque	2	7.80	3.90	
Error	10	24.95	2.45	
Total	17	101.1		

$\alpha = 0.05\%$  Coeficiente de variabilidad (CV) = 25.2%

Tabla 6: Prueba DLS de Fisher al 0.05% de probabilidad para longitud de radícula

Tratamiento comparado con el Testigo	Promedio de longitud de radícula (mm)	Significación
T0	5.90	*
T1	5.89	*
T2	4.40	*
T3	8.30	n.s.
T4	3.80	*

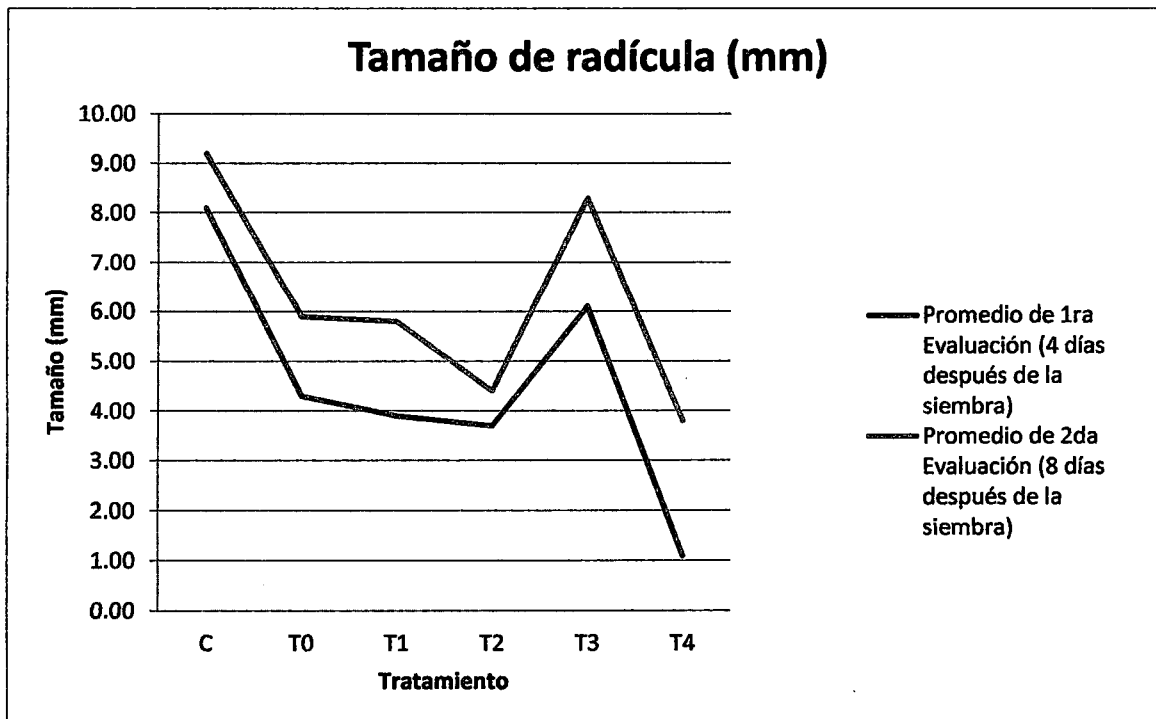
En la tabla 7 se muestran los resultados de la evaluación de la longitud de radícula, medidas en milímetros. Las mediciones se dieron dentro de los primeros diez días de desarrollo de las plántulas. Las diferencias entre las medidas de los tratamientos que se muestran en dicha tabla corroboran claramente el resultado del análisis estadístico (Tabla 5).

El gráfico 4 presenta la comparación entre los tratamientos en ambas mediciones de radícula.

Tabla 7: Resultados de la medición de longitud (mm) de radícula

	Promedio de 1ra Evaluación (4 días después de la siembra)	Promedio de 2da Evaluación (8 días después de la siembra)
C	8.10	9.20
T0	4.30	5.90
T1	3.90	5.80
T2	3.70	4.40
T3	6.10	8.30
T4	1.10	3.80

Gráfico 4: Porcentaje de germinación de semillas de Salvia sometidas a diferentes dosis de Azida de sodio



Todos los tratamientos generaron una reducción en tamaño de las radículas de las plántulas de Salvia (aunque en el caso del T3 no se trató de una diferencia significativa) respecto al tratamiento testigo (C), tal como se muestra en la tabla 8.

Tabla 8: Reducción (%) de la longitud de radícula respecto al testigo (C)

Tratamiento	Reducción en la longitud de radícula (%)
C	0.00 (Base)
T0	35.87
T1	36.96
T2	52.17
T3	9.78
T4	58.70

## 8.2 RESULTADOS DE ENSAYO EN INVERNADERO

### 8.2.1 SOBREVIVENCIA

En la tabla 9 se presenta el análisis de varianza que determina la diferencia significativa del número promedio de plantas por maceta entre los diferentes tratamientos.

Se realizó la prueba DLS de Fisher sobre el promedio final de plantas por maceta (Tabla 10). Se determinó que todos los tratamientos muestran diferencias significativas respecto del testigo.

Se pueden notar en ambos análisis estadísticos los efectos que ocasionó la azida de sodio en la sobrevivencia de plantas a medida que se modificaba su dosis comparada con el testigo.

Tabla 9: Análisis de varianza del número promedio de plantas por maceta

Fuente de variación	GL	SC	CM	F VAL
Tratamiento	5	1548.96	309.79	37.73*
Bloque	11	163.38	14.85	
Error	55	451.535	8.21	
Total	71	2163.88		

$\alpha = 0.05\%$  Coeficiente de variabilidad (CV) = 19%

43777

Tabla 10: Prueba DLS de Fisher al 0.05% de probabilidad para número de plantas por maceta

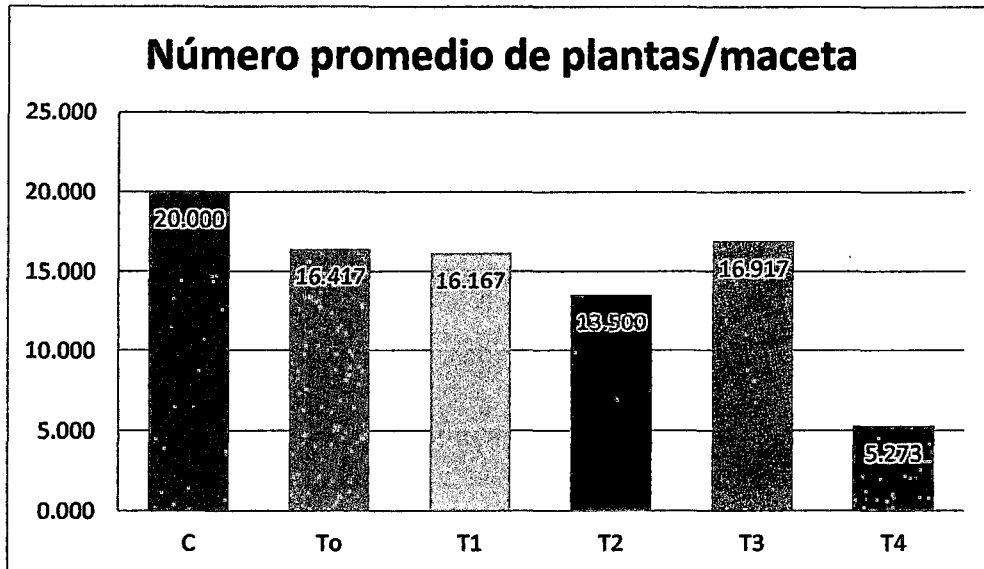
Tratamiento comparado con el Testigo	Promedio de sobrevivencia (plantas/maceta)	Significación
T0	16.42	**
T1	16.17	**
T2	13.50	**
T3	16.92	*
T4	5.27	**

Se realizaron conteos para medir la supervivencia de las semillas sembradas en macetas. A continuación se muestran los resultados de las diferentes evaluaciones (Tabla 11), además se presenta un gráfico (Gráfico 5) donde se observa el promedio final de plantas por tratamiento por maceta. Es pertinente señalar en este punto la tendencia similar observada entre los resultados de sobrevivencia y germinación, lo que permite tomar, con mayor probabilidad, los cambios con respecto al testigo como efectos de la azida de sodio.

Tabla 11: Promedio de plantas por maceta

Días después de la siembra	C	To	T1	T2	T3	T4
4	9.750	3.667	2.833	1.818	4.833	0.083
6	18.917	12.750	11.833	10.273	15.000	1.917
8	19.750	15.750	15.333	13.091	17.000	4.667
11	20.583	16.500	16.583	14.818	18.000	5.750
119	20.000	16.417	16.167	13.500	16.917	5.273

Gráfico 5: Promedio final de plantas por maceta en cada tratamiento

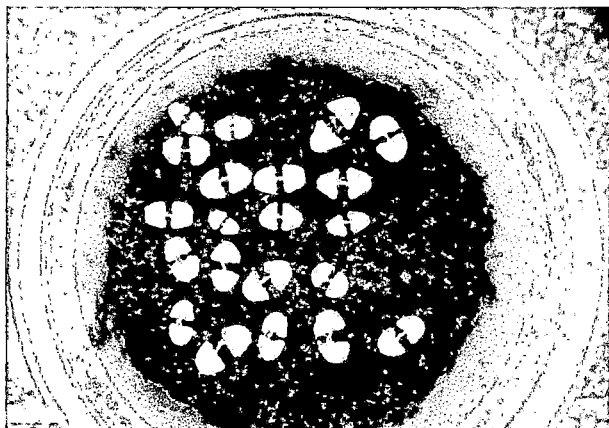


Todos los tratamientos generaron una reducción en el número promedio de plantas por maceta respecto al tratamiento testigo (C), tal como se muestra en la tabla 12.

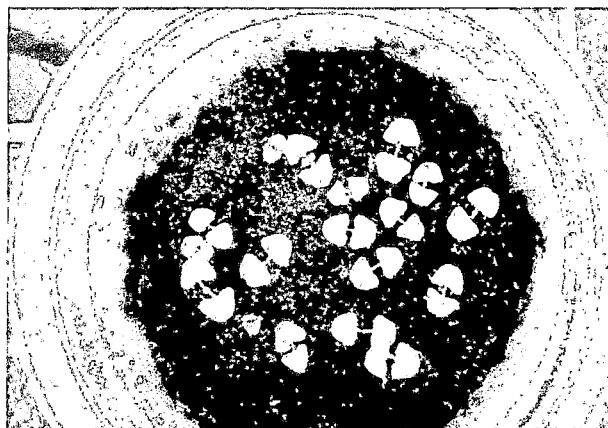
Tabla 12: Reducción (%) sobre el número promedio de plantas por maceta respecto del testigo (C)

Tratamiento	Reducción en el promedio de plantas por maceta (%)
C	0.00 (Base)
T0	17.92
T1	19.17
T2	32.50
T3	15.42
T4	73.64

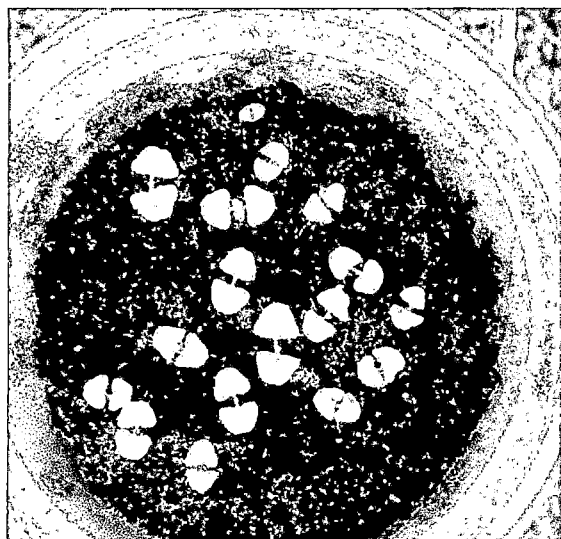
**Imagen 6: Supervivencia de plantas. Control.  
(8vo día después de la siembra)**



**Imagen 7: Supervivencia de plantas. T0 (Buffer)  
(8vo día después de la siembra)**



**Imagen 8: Supervivencia de plantas. T1 (1mM)  
(8vo día después de la siembra)**



**Imagen 9: Supervivencia de plantas. T2 (3mM)  
(8vo día después de la siembra)**

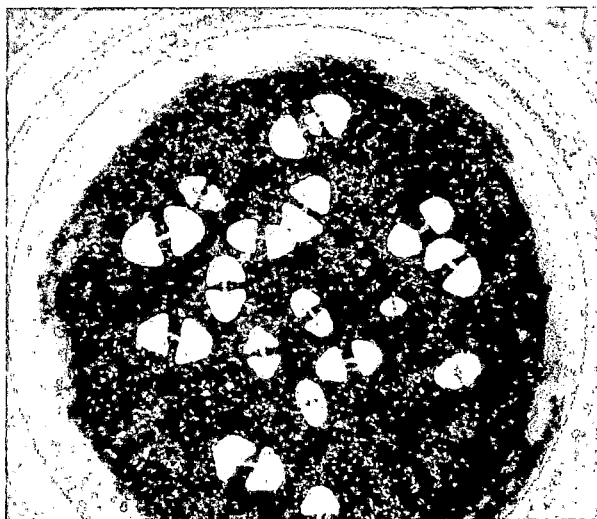


Imagen 10: Supervivencia de plantas. T3 (5mM)  
(8vo día después de la siembra)

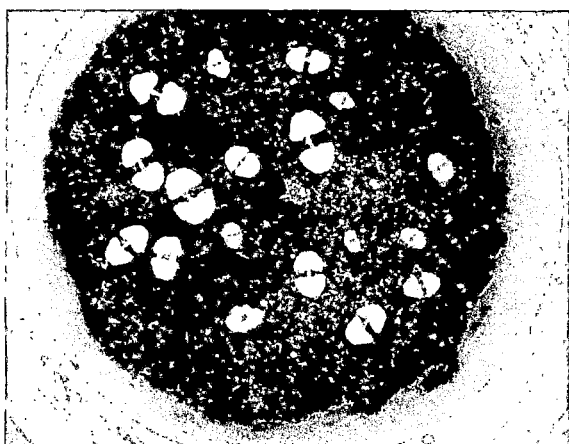
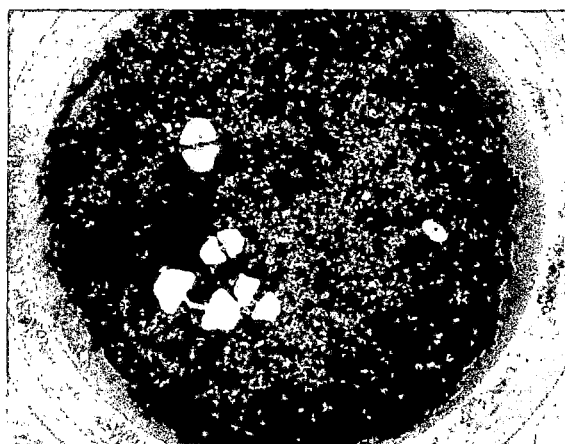


Imagen 11: Supervivencia de plantas. T4 (7mM)  
(8vo día después de la siembra)



### 8.2.2 ALTURA DE PLANTA

En la tabla 13 se presenta el análisis de varianza que determina la diferencia significativa de la altura de planta entre los diferentes tratamientos.

Tabla 13: Análisis de varianza para la altura planta (medida en cm)

Fuente de variación	GL	SC	CM	F VAL
Tratamiento	5	203.04	40.61	8.93*
Bloque	11	101.67	9.24	
Error	55	250.39	4.55	
Total	71	551.1		

$\alpha = 0.05\%$  Coeficiente de variabilidad (CV) = 10.5%



Se realizó la prueba DLS de Fisher sobre el promedio de altura de plantas (Tabla 14). Se determinó que dos de los tratamientos muestran diferencias significativas respecto del testigo. De esta forma se aprecia el efecto, significativo en dos casos, de la azida de sodio en el tamaño de planta de Salvia a medida que se incrementa su dosis con respecto al testigo.

Tabla 14: Prueba DLS de Fisher al 0.05% de probabilidad para altura de planta

Tratamiento comparado con el Testigo	Promedio de altura (cm)	Significación
T0	19.50	n.s.
T1	18.79	n.s.
T2	19.85	n.s.
T3	21.12	*
T4	23.76	**

Se realizaron mediciones semanales para obtener la altura de promedio de plantas por maceta. A continuación se muestran los resultados de tres diferentes medidas obtenidas para los diferentes tratamientos (Tabla 15).

Tabla 15: Altura promedio de plantas (cm) durante tres momentos del experimento

Días después de la siembra	C	To	T1	T2	T3	T4
27	10.83	11.00	10.53	10.10	10.79	7.72
69	16.77	16.40	17.04	17.58	18.49	21.21
119	19.23	19.50	18.79	19.85	21.12	23.76

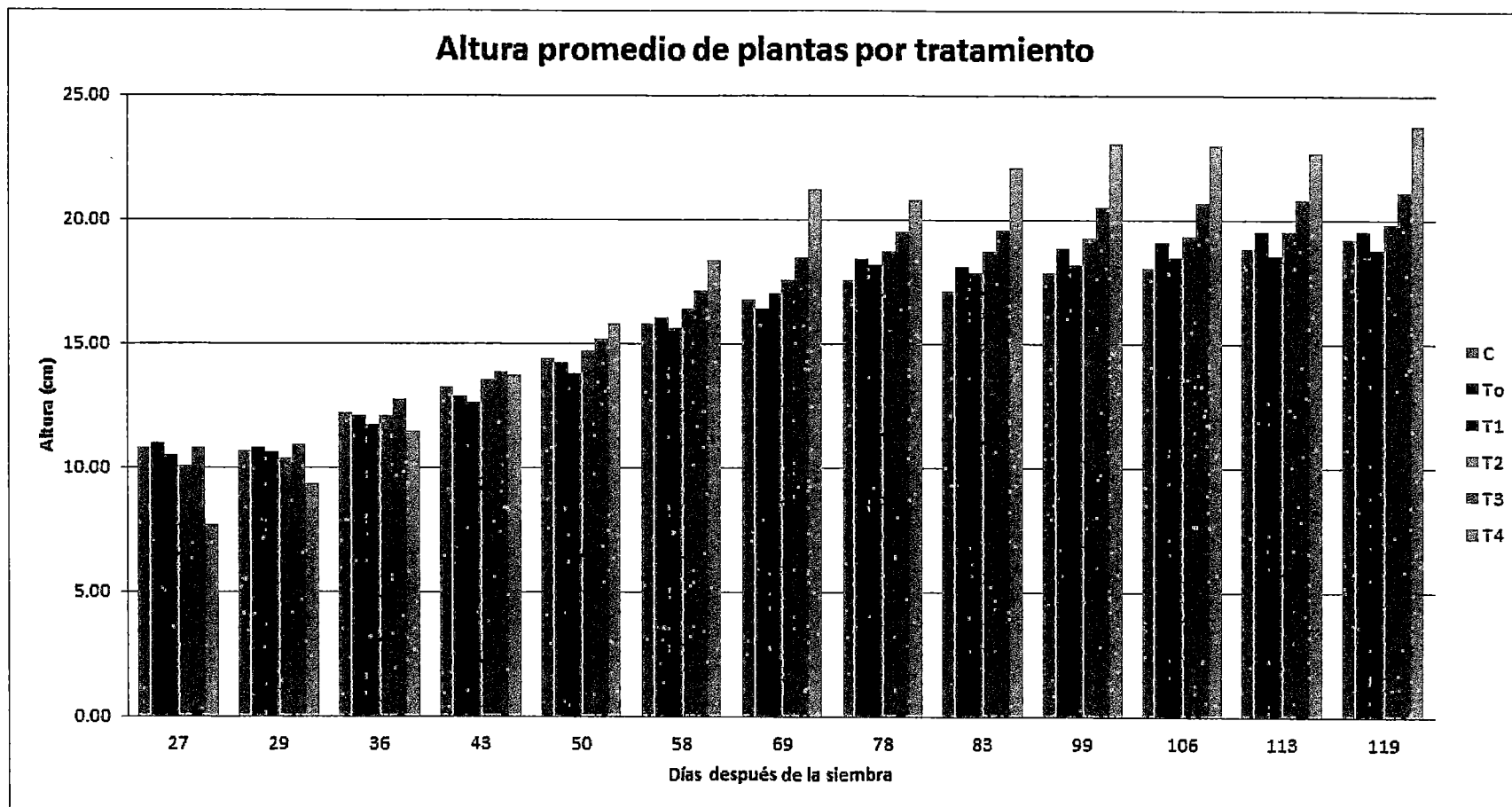
Además se presenta un gráfico (Gráfico 6) donde se observa el desarrollo de la altura de plantas por tratamiento a lo largo del ensayo.

En la Tabla 16 se observa el efecto (en términos porcentuales) de cada tratamiento sobre la altura promedio de planta. No todos los tratamientos generaron efectos en el mismo sentido en la altura promedio de plantas respecto al tratamiento testigo (C).

Tabla 16: Efecto (%) sobre la altura promedio de plantas respecto del testigo (C)

Tratamiento	Efecto en la altura de planta (%)
C	0.00 (Base)
T0	1.43
T1	(-)2.25
T2	3.25
T3	9.84
T4	23.61

Gráfico 6: Altura promedio de planta (cm)



### 8.2.3 NÚMERO DE VARILLAS FLORALES

En la Tabla 17 se presenta el análisis de varianza que determina la diferencia significativa del número promedio de varillas florales entre los diferentes tratamientos.

Se realizó la prueba DLS de Fisher sobre el promedio de número de varillas (Tabla 18). Se determinó que sólo uno de los tratamientos, el de mayor dosis de azida de sodio (7mM), muestra diferencia significativa respecto del testigo.

Tabla 17: Análisis de varianza para el número promedio de varillas florales. Transformación  $\sqrt{x+0.5}$ .

Fuente de variación	GL	SC	CM	F VAL
Tratamiento	5	2.47	0.494	11.49*
Bloque	11	1.45	0.132	
Error	55	2.37	0.043	
Total	71	6.29		

$\alpha = 0.05\%$  Coeficiente de variabilidad (CV) = 23.6%

Tabla 18: Prueba DLS de Fisher al 0.05% de probabilidad para promedio de varillas florales. Transformación  $\sqrt{x+0.5}$ .

Tratamiento comparado con el Testigo	Promedio de número de varillas	Significación
T0	0.8365	n.s.
T1	0.7934	n.s.
T2	0.8365	n.s.
T3	0.8231	n.s.
T4	1.2814	**

Se contabilizó el número de varillas florales por maceta desde su aparición. Las evaluaciones dieron como resultado los promedios de varillas florales que se muestran en la Tabla 19. Además, el Gráfico 7 muestra el desarrollo del número de varillas florales por tratamiento. En esta evaluación todos los valores resultaron positivos comparados con el tratamiento testigo (C), tomando en cuenta que ninguna de las repeticiones de dicho tratamiento generó varillas florales. Se podría decir por tanto que en todos los tratamientos se presentó un desarrollo prematuro de las inflorescencias.

Tabla 19: Número de varillas florales por tratamiento

Días después de la siembra	C	T0	T1	T2	T3	T4
66	0	3	1	3	2	12
82	0	3	1	2	2	12
89	0	3	2	3	2	13
96	0	3	1	4	1	16
102	0	3	1	3	2	15
120	0	3	2	3	3	15

Gráfico 7: Número de varillas florales por tratamiento a lo largo del experimento

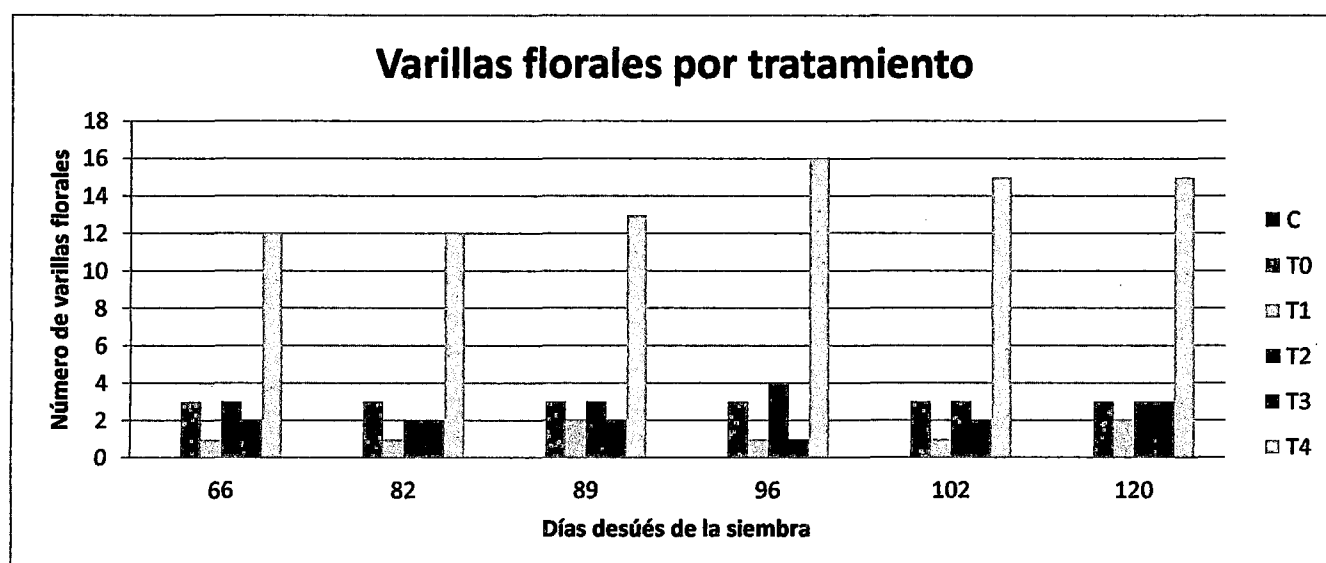


Imagen 12: Longitud de varilla floral (T4)

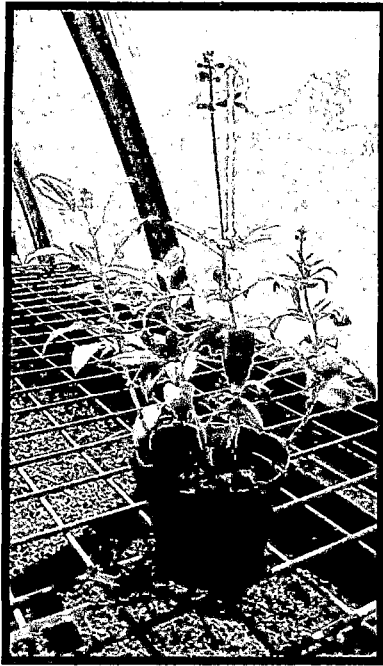
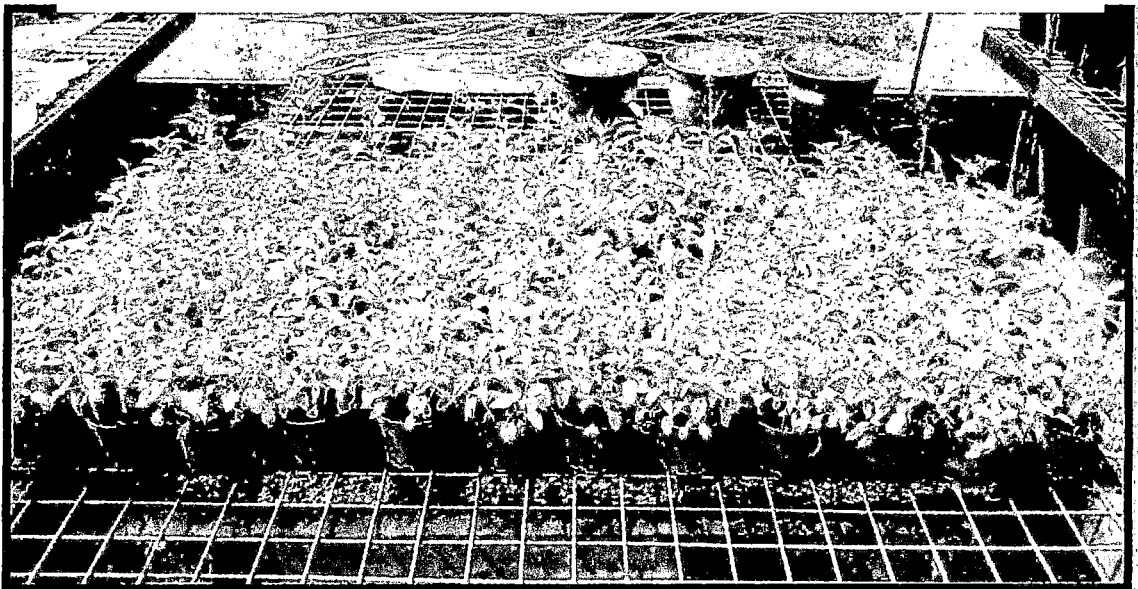


Imagen 13: Presencia inicial de varilla floral (T2)



Imagen 14: Conjunto de plantas desarrolladas en invernadero, día 119. (Fila inferior corresponde al Control y fila superior al T4).



### 8.3 OTROS EFECTOS OBSERVADOS

Al realizarse las evaluaciones que antes se explicaron se observó una característica morfológica diferente en los tratamientos T1, T2 y T3 (1mM, 3mM y 5mM, respectivamente) con respecto al testigo. En dichos tratamientos se observó la presencia de plántulas con tres hojas cotiledonales. Este cambio se presentó en sólo una plántula de cada tratamiento; posteriormente no se produjo ninguna ventaja o diferencia aparente entre los individuos que presentaron esta diferencia y el resto de la muestra. No se puede confirmar que se trate de una mutación debido a que el número de cotiledones es una característica que posee la semilla desde su formación. De todos modos se podría recomendar que se lleve a cabo, en un ensayo posterior, la observación en la M2 de los tratamientos que presentaron este cambio.

Imagen 15: Plántula con tres hojas cotiledonales (T1)

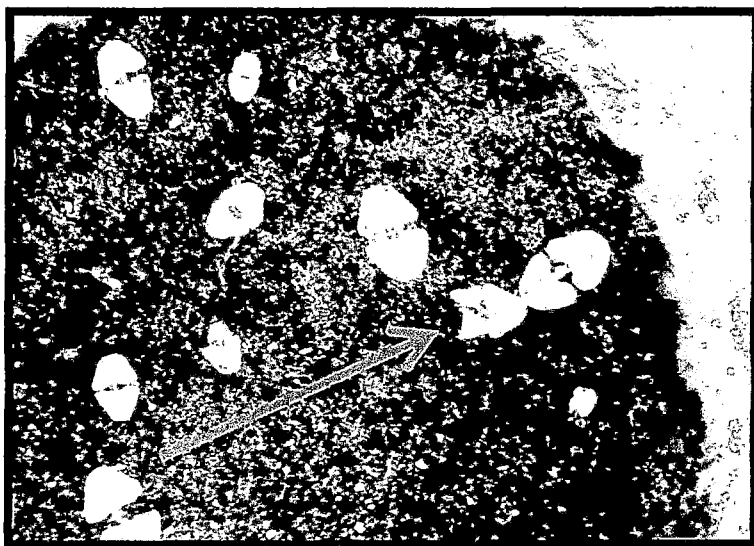


Imagen 16: Plántula con tres hojas cotiledonales (T2)

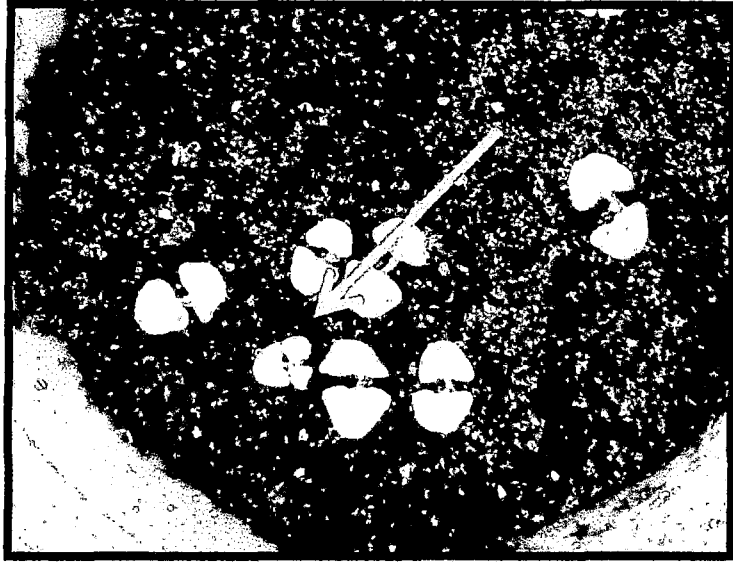
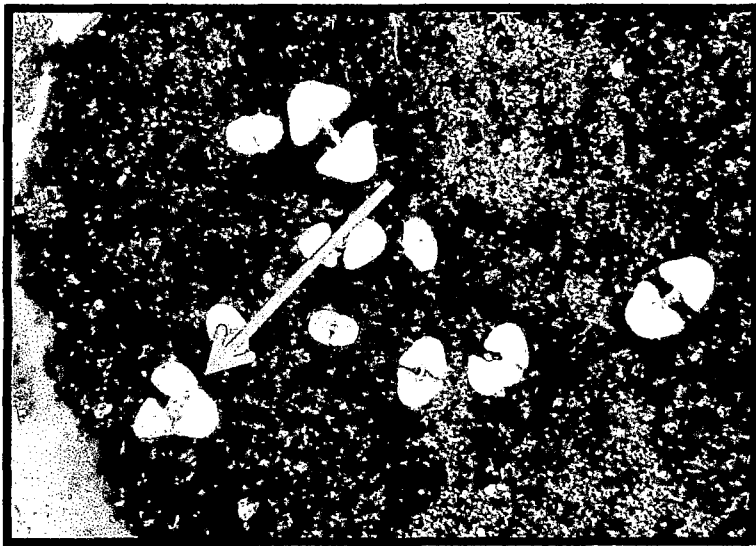


Imagen 17: Plántula con tres hojas cotiledonales (T3)





## IX. DISCUSIÓN

Existen reportes de trabajos con *Salvia farinacea*, y con otras plantas de la misma familia, relacionados con la mutagénesis pero siempre enfocados en determinar los efectos antimutagénicos del género *Salvia* y no apuntando los efectos que sobre estas plantas puedan tener agentes químicos que inducen mutaciones. Es interesante en este sentido el trabajo presentado por Mathew y Thoppil (2012) donde se evalúan los efectos antimutagénicos de los extractos de diferentes especies de *Salvia*. Dicho ensayo determinó el potencial antimutagénico del extracto de *Salvia farinacea* sobre aberraciones cromosómicas en ratones de laboratorio.

A continuación se tratará de contrastar los resultados obtenidos con la información disponible buscando avanzar en el conocimiento de los efectos que el agente mutagénico azida de sodio podría tener sobre las semillas de *Salvia farinacea* var. Blue Bedder.

### 9.1 GERMINACIÓN Y TAMAÑO DE RADÍCULA

Tal y como se observa en los resultados las mínimas reducciones de germinación (12.74%) y de tamaño de radícula (26.37%) se obtuvieron con el tratamiento T3 de 5mM de azida de sodio. Este dato inicial permitió, en términos generales, suscribir el planteamiento que dosis muy elevadas de azida de sodio produce letalidad elevada así como mayor posibilidad de observar cambios mientras que dosis reducidas generan menos letalidad pero también menos probabilidad de cambios genéticos (García *et al*, 2010). Frente a esto surge la alternativa de variar, en experiencias posteriores, el tiempo de exposición al agente y no la concentración del mismo, aunque, como lo plantean Pande y Khetmalas (2012) ambos factores pueden ocasionar un decrecimiento en la germinación.

También en evaluaciones de germinación luego haber probado diferentes dosis de azida de sodio sobre semillas Mostafa (2012) anota la caída de los valores de germinación en referencia al testigo.

El efecto del pH del medio donde se encontraban en remojo las semillas es un factor a tener en cuenta cuando se evalúa la germinación. En este caso el tratamiento con la solución buffer (T0) permite “desenmascarar” el efecto del medio ácido y de esta forma observar el descenso de la germinación a 67%. En lo que corresponde a la germinación se debe aceptar la gran influencia del factor físico (pH) del agente mutagénico y en menor medida considerar los resultados como cambios genéticos estrictamente.

En cuanto al tamaño de la radícula se observa como todos los tratamientos, excepto uno (T3), presentan diferencias significativas respecto del testigo y todas ellas con longitudes de raíces menores. La literatura menciona constantemente como centros normales de desarrollo de esta planta zonas cálidas (Ryan, 2002) por lo que, dado que todos los resultados obtenidos se encontraban por debajo de los valores del testigo, el T3 que no presentó diferencia significativa respecto del testigo se presenta como el más favorable.

## **9.2 SOBREVIVENCIA Y TAMAÑO DE PLANTA**

Es coherente observar como los resultados de mayor y menor sobrevivencia, T3=84.6% y T4=26.36% respectivamente, coinciden con los resultados de mayor y menor germinación, T3=87.3% y T4=10.0% respectivamente. Esta primera apreciación permite afirmar que los resultados que se obtuvieron en las evaluaciones posteriores no se vieron afectados, de manera determinante, por algún factor de siembra extraño al experimento (diferencias en sustrato, profundidad de siembra, pérdida de semilla al momento del riego, etc.).

En cuanto al tamaño de planta la mayoría de los tratamientos mostraron un incremento en el tamaño de planta respecto del testigo. Si bien el tratamiento con mayor concentración de azida de sodio (T4=7mM) fue el que presentó la mayor altura promedio

seguido del tratamiento T3=5mM, es interesante observar el cruce de los datos de sobrevivencia y altura de plantas para tener una mejor apreciación del efecto conjunto (Tabla 20)

Tabla 20: Cruce de datos correspondientes a altura de plantas/maceta y número de plantas/maceta.

	Control	T0	T1	T2	T3	T4
Altura de planta/maceta	19.23	19.50	18.79	16.54	21.12	21.78
Número de plantas/maceta	20.00	16.42	16.17	13.50	16.92	5.27
Producto	384.50	320.13	303.80	223.31	357.22	114.86

Los que se muestran como productos en la tabla anterior son valores adimensionales, que si se fuerzan un poco podrían tratarse de una altura total de planta por tratamiento, que ante la ausencia del dato de masa vegetal nos sirve para reconocer al tratamiento 3 (T3) como el de mejores resultados en las dos variables que aquí se comentan.

En este sentido Adamu y Aliyu (2007) señalaron la concentración relativamente elevada de 4mM de azida de sodio como responsable de cambios significativos en variables tales como sobrevivencia de semillas, peso de semillas, número de hojas por planta y peso en la planta madura. También en referencia a la altura de planta, señalan Mohana y Reddi (1986) que la dosis de azida de sodio más efectiva para inducir cambios genéticos en la morfología fue la de 5mM.

#### 9.4 VARILLAS FLORALES

Esta característica de gran interés comercial al tratarse la *Salvia* de un cultivo ornamental se ve positivamente afectada por la azida de sodio, de este modo la floración prematura con respecto al testigo puede ser considerada como un efecto favorable y por lo tanto deseable.

En cuanto al número de varillas florales que se obtuvieron, de lejos el tratamiento con mayor concentración de agente mutagénico fue el más efectivo. Pero se debe entender esta efectividad como producto de por lo menos dos razones que saltan a la vista: efecto del agente mutagénico y ausencia de competencia, aunque este segundo factor en menor medida.

El efecto directo de la azida de sodio sobre cambios genéticos en las flores o inflorescencias está ampliamente estudiado, tal como lo mencionan El-Mokadem y Mostafa (2013) cuando obtuvieron cambios genéticos en color y forma de flores con dosis de 800ppm de azida de sodio aplicados a *Browallia speciosa*. De esta forma la marcada diferencia (favorable al número de tallos y desfavorable si se observa la letalidad) es resultado muy probable del tratamiento aplicado, T4 (7mM). Y es justamente la letalidad, mencionada anteriormente al mostrar los resultados de germinación, otro factor influyente en el número de varillas florales aunque de forma indirecta. Un menor número de plantas propició un mejor aprovechamiento de nutrientes y luz y por lo tanto un mayor incentivo para un desarrollo de las inflorescencias sin competencia.

Si se entiende esta prematura floración como un efecto de la azida de sodio, dado que sin importar la dosis del mutágeno que se empleó siempre se observó presencia de varillas florales, está demás justificada la posibilidad de realizar futuros ensayos donde se determinen las dosis óptimas de azida de sodio para los demás parámetros estudiados (altura, germinación, tamaño de radícula, sobrevivencia) ya que aparentemente siempre se tendrá asegurada una temprana emisión de varillas florales.

## 9.5 EFECTO CONJUNTO DE AZIDA DE SODIO EN PARÁMETROS ESTUDIADOS

A continuación se presenta la Tabla 21, en ella se observan los efectos, en términos porcentuales de cada uno de los tratamientos sobre cada uno de los parámetros evaluados. Además se muestra el efecto total obtenido por cada tratamiento incluyendo al Buffer.

Tal como señalan las experiencias de Adamu y Aliyu (2007); Mohana y Reddi (1986) o Mostafa (2011), entre otros, los cambios que se generan en las plantas cuando las semillas que las originan son sumergidas en diferentes dosis de azida de sodio se refieren a modificaciones de su morfología y viabilidad (germinación, sobrevivencia) claramente apreciables y medibles. En este sentido, y como lo menciona Heros (1999), pocas son las aberraciones cromosómicas que se observan con este agente químico y muy eficiente es su actividad mutagénica.

Tabla 21: Efecto promedio de cada tratamiento obtenido sobre las semillas de Salvia, en términos porcentuales

Tratamiento	Efecto en la altura de planta (%)	Efecto en supervivencia de plantas por maceta (%)	Efecto en la germinación (%)	Efecto en la longitud de radícula (%)	Efecto promedio (%)
C	0.00 (Base)	0.00 (Base)	0.00 (Base)	0.00 (Base)	-
T0 (Buffer, pH:3)	1.43	17.92	22.39	35.87	19.40
T1 (1mM)	2.25	19.17	16.22	36.96	18.65
T2 (3mM)	3.25	32.50	20.46	52.17	27.10
T3 (5mM)	9.84	15.42	12.74	9.78	11.95
T4 (7mM)	23.61	73.64	89.96	58.70	61.48

En la tabla superior se observa como la dosis del tratamiento T4 (7mM) es la que mayor efecto causó sobre el desarrollo de las semillas de Salvia, mientras que la dosis del tratamiento T3 (5mM) es la que menos efectos causó; es importante tomar en cuenta que en

las evaluaciones de germinación, tamaño de radícula y sobrevivencia (número de plantas por maceta) se observó siempre un efecto de reducción con respecto al control.

De esta forma, los valores extremos del efecto promedio se encuentran en los dos tratamientos con mayor dosis de azida de sodio, esto es un apunte importante para futuros ensayos pues se podrían probar nuevas concentraciones de azida de sodio entre 5mM y 7mM hasta alcanzar aquella que provoque los mayores efectos favorables sobre el material vegetal.

## **9.6 AZIDA DE SODIO**

Tal como señalan Shu *et al* (2012), el agente azida de sodio no sólo genera cambios genéticos sino que también posee efectos fisiológicos sobre la planta pudiendo inhibir diferentes actividades y ciclos celulares. Y tal como menciona Van Harlen (1998) son las mutaciones de punto con mínimas deleciones un aspecto favorable de este agente. En cada una de las variables estudiadas se ha observado el efecto de la azida de sodio, siendo casi todos los efectos estadísticamente significativos. Uno de los efectos en la fisiología de la planta causado por este agente es la reducción de la división celular relacionada con la deficiencia de ATP, esta característica puede ser tomada en cuenta al momento de observar los drásticos efectos de la azida de sodio sobre la germinación de las semillas de Salvia.

En cuanto a los efectos mutagénicos, Jiménez (1999) y Shu *et al* (2012) señalan como bajas dosis de tratamientos combinados de azida de sodio con algún otro agente (químico o físico) producen una alta frecuencia de mutaciones puntuales.

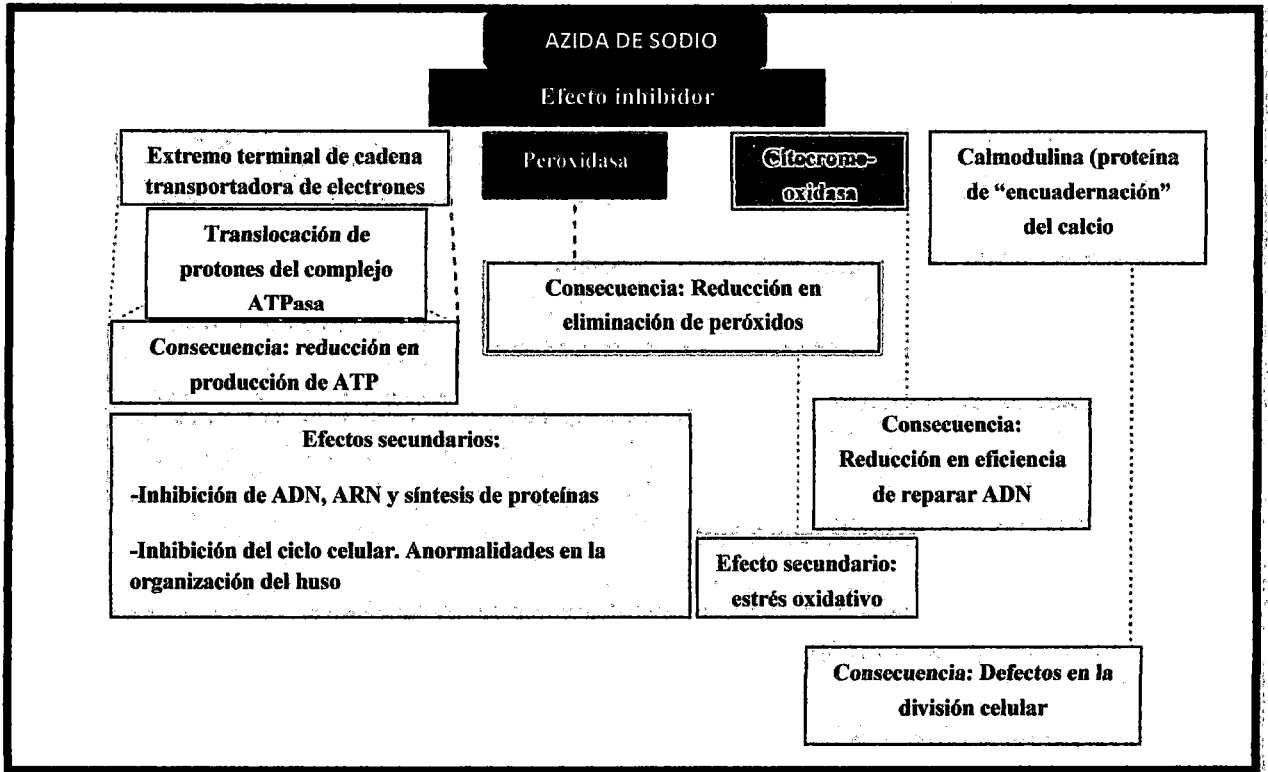


Gráfico 8: Efecto inhibidor de azida de sodio sobre diferentes procesos celulares. Traducido de Shu *et al* (2012).

## X. CONCLUSIONES

- 10.1 Fue posible evaluar el efecto del agente mutagénico químico azida de sodio sobre las semillas de *Salvia farinacea* Benth. var. Blue Bedder y sobre su posterior desarrollo.
- 10.2 Existieron diferencias significativas en cada uno de los parámetros evaluados lo que permite plantear el posible efecto de la azida de sodio como agente mutagénico. De la misma forma algunos parámetros que presentaron elevada media en algunos tratamientos, como altura de planta o número de varillas florales, se vieron favorecidos por la poca competencia entre plantas debida a la alta mortalidad en dichos tratamientos.
- 10.3 Se determinó que las diferentes dosis de azida de sodio causaron diferentes efectos en cada uno de los parámetros evaluados, siendo resaltante el hecho que dosis muy elevadas de azida de sodio disminuyeron considerablemente la germinación a la vez que favorecieron la altura de la planta o el número elevado de varillas florales.
- 10.4 Es posible afirmar que, bajo las condiciones que se plantearon en el presente trabajo, la dosis de azida de sodio que puede generar cambios genéticos significativos se encuentra en el rango de los dos tratamientos con más altas concentraciones de agente mutagénico.



## **XI. RECOMENDACIONES**

- 11.1** En lo referente al tiempo de exposición de las semillas a la azida de sodio, se sugiere realizar ensayos donde el tiempo sea superior a una hora para determinar su influencia en la generación de cambios genéticos.
- 11.2** Se sugiere realizar nuevos ensayos con dosis que varíen entre concentraciones de 5mM y 7mM para lograr un mejor resultado conjunto entre las variables de germinación y tamaño de planta.
- 11.3** Emplear las diferentes dosis de azida de sodio del presente trabajo en conjunto con otro agente mutagénico para probar la efectividad al conseguir cambios genéticos.
- 11.4** Emplear, en ensayos futuros, técnicas moleculares (marcadores genéticos) para verificar que los cambios observados correspondan a cambios genéticos heredables.
- 11.5** Replicar el presente experimento hasta llegar a la generación M2 para observar los cambios genéticos que se han fijado y que podrían ser considerados como mutaciones.

## **XII. ANEXOS**

**Anexo1:** Preparación de cada uno de los tratamientos (incluidos control y buffer)

- **Control:**

Se trata de agua destilada previamente esterilizada donde se sometieron a remojo las semillas durante una hora previo a su siembra.

- **T0 (Buffer):**

Se trató de una solución buffer de pH: 3, para esto se empleó  $\text{KHPO}_3$  (0.4M) y ácido ortofosfórico de pH3

- **Tratamientos con Azida de sodio**

-T1 (1mM): Se diluyeron 3.25 mg de azida sódica en 50ml de la solución buffer previamente mencionada.

-T2 (3mM): Se diluyeron 9.75 mg de azida sódica en 50ml de la solución buffer previamente mencionada.

-T3 (5mM): Se diluyeron 16.25 mg de azida sódica en 50ml de la solución buffer previamente mencionada.

-T4 (7mM): Se diluyeron 22.75 mg de azida sódica en 50ml de la solución buffer previamente mencionada

En cada uno de los tratamientos se procedió al filtrado de las soluciones dentro de la cámara de flujo laminar para asegurar la esterilidad del proceso. Posteriormente, también en el ambiente de cámara de flujo laminar, se procedió al remojo de las semillas de salvia por una hora.

Luego del tiempo de remojo en cada uno de los tratamientos se realizó un triple enjuague.

Imagen 14 : Recipientes con agua estéril para realizar el triple enjuague en ambiente aséptico.



**Anexo2:** Componentes del medio de cultivo MS, sin vitaminas ni reguladores de crecimiento, empleado en la fertilización de los tratamientos en invernadero.

Tabla 22: Composición de medio de cultivo MS según Murashige and Skoog

		mg/L
Macronutrientes	(NH <sub>4</sub> )NO <sub>3</sub>	1650
	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	370
	KNO <sub>3</sub>	1900
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170
	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	440
Micronutrientes	FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	27.8
	Na <sub>2</sub> EDTA	37.3
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.2
	MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	22.3
	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8.6
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.25
	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0.025
	CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0.025
	KI	0.83

### XIII. BIBLIOGRAFÍA

- 1) Adamu, A.; Aliyu, H. 2007. Morphological effects of sodium azide on tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill). Science World Journal. Nigeria. 2(4). Páginas: 9-12
- 2) Al-Qurainy, F. 2009. Effects of Sodium Azide on Growth and Yield Traits of Eruca sativa (L.). World Applied Sciences Journal. Kingdom of Saudi Arabia. 7 (2). Páginas: 220-226
- 3) Ali, A., Yubey K., Deka, U., Tomar, S. 2014. Effect of Sodium Azide on Seed Germination and Related Agro-Metrical Traits in M Lentil ( 1 Lens culinaris Medik.) Generation. World Journal of Agricultural Sciences. India. 10 (3). Páginas: 95-102.
- 4) Benites, A. 2005. Avances recientes en biotecnología vegetal e ingeniería genética de plantas. Reverte, España. 232 pp.
- 5) Broertjes C., Van Harten, A. 1978. Application of Mutation Breeding Methods in the Improvement of vegetatively propagated crops, Volumen 2. Elsevier. Holanda. 323 pp.
- 6) Catañón, G. 2002. La biotecnología y el mejoramiento genético vegetal. Kukulcab Revista de divulgación. México. 7 (14). Páginas. 1-15.
- 7) Censo Nacional de Productores de Flores 1998, Ministerio de Agricultura del Perú.
- 8) Chávez-Tafur, J. 1991. Efecto comparativo de diferentes fuentes mutagénicas en cebada (*Hordeum vulgare*) variedad Buenavista. Universidad Nacional Agraria La Molina. 81 pp.

- 9) Coronado, K. 2006. Estudio de la densidad de siembra y la altura de corte en el cultivo de salvia (*Salvia officinallis* L.) para la industria del liofilizado. Tesis Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima. 67pp.
- 10) Covarrubias, A. 2009. El mejoramiento clásico y moderno de cultivos vegetales: sus ventajas y limitaciones (Parte I). Academia de Ciencias de Morelos. Artículo publicado en: <http://www.acmor.org.mx/?q=content/el-mejoramiento-cl%C3%A1sico-y-moderno-de-cultivos-vegetales-sus-ventajas-y-limitaciones-parte-i> (Tomado el 20 de Noviembre de 2014)
- 11) Delgado de la Flor, L. 1970. Frecuencia de mutaciones inducidas por radiación gamma y metanosulfonato de etilo en la semilla de frijol. Instituto Iberoamericano de ciencias agrícolas de la OEA, Costa Rica. 30pp.
- 12) El-Mokadem, H; Mostafa, G. 2013. Induction of mutations in *Browallia speciosa* using sodium azide and identification of the genetic variation by peroxidase isozyme. African Journal of Biotechnology. Egypt 13(1), páginas 106-111
- 13) Fenoll, C; Gonzáles, F. 2010. Transgénicos. CSIC - CSIC Press, Esáña . 224 pp
- 14) Fernández, J. 2006 Revisión taxonómica de *Salvia* sect. *Siphonantha* (Labiatae). Anales Jardín Botánico. Madrid 63 (2). Páginas 145-157
- 15) Font Quer, P. 2000. Diccionario de Botánica. Ediciones Península, España. 1244pp
- 16) García, A.; Porras, I.; Jiménez, J. 2010. Primer congreso peruano de mejoramiento genético y biotecnología agrícola: Evaluación del efecto de la azida de sodio en la germinación de la semilla de quinua para la inducción de mutaciones. Escuela de Postgrado Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima. 160 pp.

- 17) Gilman, E.; Howe, T. 1999. Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences. University of Florida. Fact Sheet FPS-522. <http://edis.ifas.ufl.edu/fp523> (Tomado el 1 de Septiembre de 2014)
- 18) Guillot, D. 2009. Flora ornamental española: aspectos históricos y principales especies. Rev. Bouteloua 8, España. 274 pp.
- 19) Heros, E. 1999. Mejoramiento genético de la kiwicha (*Amaranthus caudatus* L.), mediante la inducción de mutaciones. Universidad Nacional Agraria La Molina. 101pp.
- 20) Infojardin. <http://articulos.infojardin.com/aromaticas/Fichas/Salvia.htm> (Tomado el 21 de Agosto de 2014)
- 21) Integrated taxonomic information system (ITIS). 2014. [http://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search\\_topic=TSN&search\\_value=32713](http://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=32713) (Tomado el 5 de Agosto de 2014)
- 22) Jiménez, J. 1999. Desarrollo de líneas mutantes dobles haploides de cebada (*Hordeum vulgare* L.) mediante el cultivo "in vitro" de anteras y su evaluación en condiciones de campo. Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima. 87pp.
- 23) Kleinhofs, A., Sander, C., Nilan, R.A., Konzak, C.F., 1974. Azide mutagenicity-mechanism and nature of mutation produced, Polyploidy and induced Mutation in Plant Breeding (Proc. Meeting Bari, 1972). IAEA. Vienna. 195-199
- 24) Koolman J.; Röhm, K. 2004 Bioquímica: texto y atlas. Ed. Médica Panamericana, España. 488 pp.
- 25) Levitus, G.; Echenique, V.; Rubinstein, C.; Hopp, E.; Mroginski, L. 2004. INTA, Argentina. 647pp.

- 26) Marzocca, A. 1985. Nociones básicas de taxonomía vegetal. Editor IICA, Costa Rica. 263 pp
- 27) Mathew, J.; Thoppil, J. 2012. Investigation of the antimutagenic activity of three salvia extracts. International Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences. India 3 (4). Páginas: 225-230
- 28) Mirzaei, A.; Akbartabar, M.; Mirzaei, N.; Ghafarian, R. 2013. Antioxidant, Antimicrobial and Antimutogenic Potential of 4 Iranian Medicinal Plants. Life Science Journal. Iran. 10 (7). Páginas: 1085-1091.
- 29) Mohana, R., Reddi, T. 1986. Azide mutagenesis in rice. Indian Academy of Science (Plant science). India. 96 (3). Páginas 205-215
- 30) Mostafa, G. 2011. Effect of sodium azide on the growth and variability induction in *Helianthus annuus* L. International Journal of Plant Breeding and Genetics. Egypt. 5 (1). Páginas 76-85
- 31) Nodarse, O., Santana, I., China, A., Carbó, L., Días, A., Hernández, C. 1992. Obtención y selección de sub- clones de caña de azúcar resistentes a la roya a partir de la variedad c127-78 mediante cultivo de tejidos. Revista científica Caña de azúcar. Cuba . 10(2). Páginas 61-70.
- 32) Oliva, R. 2004. Genética médica. Ediciones Universitat Barcelona, España. 346pp.
- 33) Otahola-Gómez, V.; Aray, M.; Antoima, Y. 2001. Inducción de mutantes para el color de la flor en crisantemos (*Dendranthema grandiflora* (Ram.) Tzvelev) mediante radiaciones gamma. Revista científica UDO agrícola. España. 1 (1). Páginas: 56-63.



- 34) Pabón, L. 2011. Inducción de mutaciones mediante radiaciones gamma de (*Passiflor edulis* Sim var. *Edulis*). Universidad Nacional de Colombia. Colombia. 80pp
- 35) Pande, S., Khetmalas, M. 2012. Biological Effect of Sodium Azide and Colchicine on Seed Germination and Callus Induction in *Stevia rebaudiana*. Asian Journal of Experimental Biological Sciences. India. 3 (1). Páginas: 93- 98
- 36) Ryan, J. 2002. Perennial garden for Texas. University of Texas Press. Texas. 386 pp.
- 37) Sander, C., Muehlbauer, F. 1977. Mutagenic effects of sodium azide and gamma irradiation in *Pisum*. Environmental and experimental botany. Estados Unidos. 17 (1). Páginas: 43-45.
- 38) Shu, Q.; Forster, B.; Nakagawa, H.; Nakagawa, H. 2012. Plant Mutation Breeding and Biotechnology. CABI . United Kingdom. 608 pp.
- 39) Seedaholic. <http://www.seedaholic.com/salvia-farinacea-victoria-blue.html>  
(Tomado el 15 de Agosto de 2014)
- 40) Sullivan, J.; Krieger, G. 2001. Clinical Environmental Health and Toxic Exposures. Lippincott Williams & Wilkins. Estados Unidos. 1323 pp
- 41) Tajehmiria, A; Ghasemib, M; Sabetb, F.; Chakoosarib, M.; Abdolazadeganb, N. 2014. Antimutagenic activity of *rosmarinus officinalis* L. by Ames test. Scientific Journal of Microbiology. Iran. 3(7). Páginas: 78-81

42) The Sarpong Group. University of California, Berkeley. Standard Operating Procedures. 2013

[http://www.cchem.berkeley.edu/rsgroup/SOPs2013/SodiumAzide\\_Sarpong.pdf](http://www.cchem.berkeley.edu/rsgroup/SOPs2013/SodiumAzide_Sarpong.pdf)

(Tomado el 8 de Enero de 2015)

43) Torres, J. 2010. Purificación y caracterización parcial de mucina citoplasmática utilizando la lectina de *Salvia bogotensis*. Universidad Nacional de Colombia, Colombia. 75pp.

44) Van Harten, A. Mutation Breeding: Theory and Practical Applications. 1998. Cambridge University Press. 353 pp.

43777