

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

FACULTAD DE AGRONOMIA



**“DETERMINACIÓN DE LA DOSIMETRÍA APLICADA A LA
SEMILLA DE ESPÁRRAGO (*Asparagus Officinalis* L.)”**

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE
INGENIERO AGRONOMO**

MIGUEL ANGEL VERA VEGA

LIMA-PERU

2019

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA

FACULTAD DE AGRONOMÍA

**“DETERMINACIÓN DE LA DOSIMETRÍA APLICADA A LA
SEMILLA DE ESPÁRRAGO (*Asparagus Officinalis* L.)”**

MIGUEL ANGEL VERA VEGA

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

Sustentada y aprobada ante el siguiente jurado:

Ing. M. S. Andrés Casas Díaz
PRESIDENTE

Dr. Jorge Jiménez Dávalos
ASESOR

Ing. Mg. Sc. Elizabeth Heros Aguilar
MIEMBRO

Ing. Saray Siura Céspedes
MIEMBRO

Lima – Perú

2019

DEDICATORIA

Esta tesis se la dedico a mis padres que me apoyaron en todo momento y al Dr. Eduardo Jiménez Dávalos, por su constante apoyo y supervisión durante el desarrollo de la tesis

INDICE GENERAL

I.	INTRODUCCIÓN	1
II.	REVISIÓN DE LITERATURA	3
	2.1 CULTIVO DE ESPÁRRAGO	3
	2.1.1 GENERALIDADES	3
	2.1.2 UBICACIÓN TAXONÓMICA	4
	2.1.3 ORIGEN E IMPORTANCIA EN EL PERÚ	4
	2.1.4 ENFERMEDADES Y PLAGAS	5
	2.1.4.1 ENFERMEDADES	5
	2.1.4.2 PLAGAS	6
	2.1.5 CULTIVARES	8
	2.1.5.1. UC 157 F1	8
	2.1.5.2. ATLAS	8
	2.1.5.3. IDA LEA	8
	2.1.6 PROPAGACIÓN	8
	2.1.6.1 PROPAGACIÓN VEGETATIVA	8
	2.1.6.2 MICROPROPAGACIÓN <i>IN VITRO</i>	9
	2.1.7 VARIACIÓN SOMACLONAL EN ESPÁRRAGO	10
	2.2 INDUCCIÓN DE MUTACIONES	11
	2.2.1 DEFINICIÓN	11
	2.2.2 TIPOS DE MUTACIONES	12
	2.2.2.1 MUTACIONES ESPONTÁNEAS	12
	2.2.2.2 MUTACIONES INDUCIDAS	12
	2.2.3 TIPOS DE AGENTE MUTAGÉNICO	13
	2.2.3.1 AGENTES MUTAGÉNICOS FÍSICOS	13
	2.2.3.2 AGENTE MUTAGÉNICOS QUÍMICOS	14
	2.2.4 INDUCCIÓN DE MUTACIONES DE ACUERDO AL TIPO DE REPRODUCCIÓN	14
	2.2.4.1 EN ESPECIES AUTÓGAMAS	15
	2.2.4.2 EN ESPECIES ALÓGAMAS	15
	2.2.4.3 EN ESPECIES DE REPRODUCCIÓN ASEXUAL	16
	2.3 AZIDA DE SODIO	16

2.3.1	GENERALIDADES	16
2.3.2	CONDICIONES DE USO COMO MUTAGÉNICO	17
2.3.2.1	TIEMPO DE EXPOSICIÓN.....	17
2.3.2.2	EFEECTO DEL PH.....	17
2.3.2.3	TEMPERATURA.....	18
2.3.3	DOSIMETRÍA.....	18
2.3.4	EFEECTO EN LAS PLANTAS	18
2.3.4.1	EFECTOS GENÉTICOS	19
2.3.4.2	EFECTOS FISIOLÓGICOS	19
2.3.4.3	EFECTOS CITOLÓGICOS.....	20
2.3.4.4	EFECTOS MORFO-FÍSICOS	20
2.3.4.5	EFECTOS EN LA PRODUCCIÓN Y CALIDAD DE LOS CULTIVOS	21
III.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
3.1	UBICACIÓN DEL ÁREA EXPERIMENTAL.	23
3.2	MATERIAL VEGETATIVO.....	23
3.3	MATERIALES Y EQUIPOS	24
3.4	METODOLOGÍA	24
3.4.1	PROCEDIMIENTOS PARA LA EJECUCIÓN DEL EXPERIMENTO..	24
3.4.2	SELECCIÓN E INDUCCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL.....	24
3.4.3	PREPARACIÓN DE BUFFER DE FOSFATO MONOBÁSICO DE POTASIO A PH 3	25
3.4.4	PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN DE AZIDA DE SODIO.....	25
3.4.5	INDUCCIÓN DE LAS SEMILLAS	25
3.4.6	INSTALACIÓN DEL EXPERIMENTO EN EL LABORATORIO.....	25
3.4.7	INSTALACIÓN DEL EXPERIMENTO EN EL TINGLADO.	25
3.4.8	VARIABLES	25
3.4.9	DISEÑO ESTADÍSTICO	27
3.4.10	POBLACIÓN Y MUESTRA	27
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	28
4.1	GERMINACIÓN.....	28
4.2	SUPERVIVENCIA.....	31
4.3	ALTURA DE PLANTA	34
4.4	PESO DEL GERMINADO.....	37
4.5	LONGITUD DE RADÍCULA	38

4.6 ESTIMACIÓN DE LA VELOCIDAD DE LA ELONGACIÓN DE LA RADÍCULA	41
4.7 ESTIMACIÓN DE LA GANANCIA DEL PESO DEL GERMINADO	43
4.8 ESTIMACIÓN DE LA VELOCIDAD DE LA ELONGACIÓN DE LA PLÁNTULA	45
4.9 RELACIÓN PLÚMULA/RADÍCULA.....	47
4.10 DL₅₀.....	49
4.11 EFECTO PROMEDIO DE LA AZIDA DE SODIO EN ESPÁRRAGO ...	50
V. CONCLUSIONES.....	52
VI. RECOMENDACIÓN.....	53
VII.BIBLIOGRAFIA.....	54
VIII. ANEXOS	67

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Análisis de variancia de la germinación de las semillas de espárrago (Alfa al 0.05).	28
Cuadro 2. Prueba Tukey ($p \leq 0.05$).de los tratamientos sobre el porcentaje de germinación (%) en espárrago	31
Cuadro 3. Análisis de variancia de la supervivencia de las semillas de espárrago (Alfa al 0.05).	31
Cuadro 4. Prueba Tukey ($p \leq 0.05$) de los tratamientos sobre el porcentaje de supervivencia (%) en espárrago.	34
Cuadro 5. Análisis de variancia de la altura de planta en espárrago (Alfa al 0.05).	34
Cuadro 6. Efecto de los tratamientos sobre la altura de planta (cm.) en espárrago. Prueba Tukey ($p \leq 0.05$).	36
Cuadro 7. Análisis de variancia del peso del germinado en espárrago (Alfa al 0.05).	36
Cuadro 8. Prueba Tukey ($p \leq 0.05$) de los tratamientos sobre el peso del germinado (gr.) en espárrago.	38
Cuadro 9. Análisis de variancia de la longitud de raíz en espárrago Alfa al 0.05)	39
Cuadro 10. Prueba Tukey ($p \leq 0.05$) de los tratamientos sobre la longitud de raíz (cm.) en espárrago.	41
Cuadro 11. Análisis de variancia de la velocidad de elongación de la radícula en espárrago (Alfa al 0.05).	41
Cuadro 12. Prueba Tukey ($p \leq 0.05$) de los tratamientos sobre la velocidad de elongación de la radícula (cm/día) en espárrago.	43
Cuadro 13. Análisis de variancia de la estimación de la ganancia de peso diario del germinado en espárrago (Alfa 0.05).	43
Cuadro 14. Prueba Tukey ($p \leq 0.05$) de los tratamientos sobre la velocidad del peso del germinado (gr/día) en espárrago.	45
Cuadro 15. Análisis de variancia de la velocidad de la elongación de la plántula (cm/día) bajo condiciones controladas en espárrago (Alfa al 0.05).	45

Cuadro 16. Prueba Tukey ($p \leq 0.05$) de los tratamientos sobre la velocidad de la elongación de la plántula bajo condiciones normales (cm/día) en espárrago.	47
Cuadro 17. Análisis de variancia de la relación plúmula-radícula en espárrago (Alfa al 0.05).	47
Cuadro 18. Prueba Tukey ($p \leq 0.05$) de los tratamientos sobre la relación plúmula-radícula en espárrago.	49
Cuadro 19. Datos promedios por dosis del porcentaje de germinación (%) de cada genotipo y el promedio de los tres para el cálculo de la DL_{50} en espárrago.	49
Cuadro 20. Efecto promedio (%) causado por las dosis de azida de sodio de los cultivares UC 157 F1 y UC 115, línea 2H-38H y el promedio de las tres.	51
Cuadro 21. Resultados del análisis de regresión, para la estimación de la velocidad de elongación de la altura de planta por repetición-tratamiento del cultivar UC 115.	67
Cuadro 22. Resultados del análisis de regresión, para la estimación de la ganancia de peso del germinado por repetición-tratamiento del cultivar UC 115.	68
Cuadro 23. Resultados del análisis de regresión, para la estimación de la velocidad de elongación de la raíz por repetición-tratamiento del cultivar UC 115.	69
Cuadro 24. Resultados del análisis de regresión, para la estimación de la velocidad de elongación de la plántula por repetición-tratamiento de la línea 2H-38H.	70
Cuadro 25. Resultados del análisis de regresión, para la estimación de la ganancia de peso del germinado por repetición-tratamiento de la línea 2H-38H.	71
Cuadro 26. Resultados del análisis de regresión, para la estimación de la velocidad de elongación de la raíz por repetición-tratamiento de la línea 2H-38H.	72
Cuadro 27. Resultados del análisis de regresión, para la estimación de la velocidad de elongación de la plántula por repetición-tratamiento del cultivar UC 157 F1.	73
Cuadro 28. Resultados del análisis de regresión, para la estimación de la ganancia de peso del germinado por repetición-tratamiento del cultivar UC 157 F1.	74
Cuadro 29. Resultados del análisis de regresión, para la estimación de la velocidad de elongación de la raíz por repetición-tratamiento del cultivar UC 157 F1.	75

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Respuesta de los cultivares de UC 157 F1 y UC 115 y de la línea de espárrago 2H-38H en el porcentaje de germinación. Prueba Tukey ($p \leq 0.05$).	29
Figura 2. Efecto de las dosis de azida de sodio en el porcentaje de germinación. Prueba Tukey ($p \leq 0.05$).	29
Figura 3. Efecto de la azida de sodio en la germinación de semillas de espárrago (UC 115, UC 157 F1 y 2H-38H).	30
Figura 4. Respuesta de los cultivares de UC 157 F1 y UC 115 y de la línea de espárrago 2H-38H en el porcentaje de supervivencia. Prueba Tukey ($p \leq 0.05$).	32
Figura 5. Efecto de las dosis de azida de sodio en el porcentaje de supervivencia. Prueba Tukey ($p \leq 0.05$).	32
Figura 6. Efecto de la azida de sodio en la supervivencia en los cultivares de espárrago UC115, UC 157 F1 y la línea 2H-38H.	33
Figura 7. Respuesta de los cultivares de UC 157 F1 y UC 115 y de la línea de espárrago 2H-38H en la altura de planta. Prueba Tukey ($p \leq 0.05$).	35
Figura 8. Efecto de las dosis de azida de sodio en la altura de planta. Prueba Tukey ($p \leq 0.05$).	35
Figura 9. Respuesta de los cultivares de UC 157 F1 y UC 115 y de la línea de espárrago 2H-38H en el peso del germinado. Prueba Tukey ($p \leq 0.05$).	37
Figura 10. Efecto de las dosis de azida de sodio en el peso del germinado. Prueba Tukey ($p \leq 0.05$).	38
Figura 11. Respuesta de los cultivares de UC 157 F1 y UC 115 y de la línea de espárrago 2H-38H en la longitud de raíz. Prueba Tukey ($p \leq 0.05$).	39
Figura 12. Efecto de las dosis de azida de sodio en la longitud de raíz. Prueba Tukey ($p \leq 0.05$).	40
Figura 13. Efecto de la azida de sodio en la longitud de radícula en los cultivares UC 115 y UC 157 F1 y la línea pura 2H-38H).	40
Figura 14. Respuesta de los cultivares de UC 157 F1 y UC 115 y de la línea de espárrago 2H-38H en la velocidad de elongación de la radícula. Prueba Tukey ($p \leq 0.05$).	42

Figura 15. Efecto de las dosis de azida de sodio en la velocidad de elongación de la radícula. Prueba Tukey ($p \leq 0.05$)	42
Figura 16. Respuesta de los cultivares de UC 157 F1 y UC 115 y de la línea de espárrago 2H-38H en la estimación de la ganancia de peso diario del germinado. Prueba Tukey ($p \leq 0.05$).	44
Figura 17. Efecto de las dosis de azida de sodio en la estimación de la ganancia de peso diario del germinado. Prueba Tukey ($p \leq 0.05$).	44
Figura 18. Respuesta de los cultivares de UC 157 F1 y UC 115 y de la línea de espárrago 2H-38H en la estimación de la velocidad de elongación de la plántula. Prueba Tukey ($p \leq 0.05$).	46
Figura 19. Efecto de las dosis de azida de sodio en la estimación de la velocidad de la elongación de la plántula. Prueba Tukey ($p \leq 0.05$).	46
Figura 20. Respuesta de los cultivares de UC 157 F1 y UC 115 y de la línea de espárrago 2H-38H en la relación plúmula/radícula. Prueba Tukey ($p \leq 0.05$).	48
Figura 21. Efecto de las dosis de azida de sodio en la relación plúmula/radícula. Prueba Tukey ($p \leq 0.05$).	48
Figura 22. Curvas de regresión y R^2 de los cultivares UC 157 F1 y UC 115, de la línea 2H-38H y del promedio para la determinación de la DL_{50} .	50

RESUMEN

El espárrago (*Asparagus officinalis* L.) es una hortaliza muy cotizada tanto en nuestro país como a nivel mundial. En el Perú la producción de los cultivares espárrago se expande por el litoral peruano, en los departamentos de La Libertad, Lima, Ica, Ancash y Lambayeque. En la actualidad los cultivares liberados están perdiendo su capacidad de resistencia y tolerancia a las plagas y enfermedades, lo que obliga a los fitomejoradores a generar nuevos cultivares que respondan a estos nuevos desafíos. La primera acción del fitomejorador es generar variabilidad genética dentro de la población y una alternativa para lograrlo es la inducción de mutaciones. Esta técnica ayuda a generar variabilidad genética, permitiendo obtener y seleccionar los genotipos con tolerancia y/o resistencia a estreses bióticos y abióticos. El experimento se llevó a cabo en la PIPS en Cereales y Granos Nativos de la Universidad Nacional Agraria La Molina. Se trabajó con tres genotipos: UC157F1, UC115 y la 2H-38H cuyas semillas fueron tratadas. Se tuvieron dos controles (agua, buffer fosfato a pH 3) y siete concentraciones de azida de sodio (1mM, 3mM, 5mM, 7mM y 9mM). Las semillas fueron sumergidas por una hora y sembradas en placas y macetas (100 por repetición) y se utilizó un diseño DBCA con arreglo factorial con 4 repeticiones. Las variables estudiadas fueron las siguientes: germinación, supervivencia, altura de planta, longitud de radícula, relación de la longitud plúmula-radícula, peso del germinado, la velocidad de elongación de la plántula y radícula y ganancia de peso del germinado, DL_{50} y el efecto promedio del agente mutagénico. Durante el análisis de las variables se observó que hubo diferencias significativas. Los tres genotipos mostraron respuestas diferentes al efecto de la azida de sodio, siendo el cultivar UC157F1 es más quimio-sensible y la dosis de 9mM de NaN_3 causó el mayor efecto.

Palabras claves: espárrago, genotipos, agente mutagénico, azida de sodio.

SUMMARY

Asparagus (Asparagus officinalis L.) is a vegetable that is highly valued both in our country and worldwide. In Peru, the production of asparagus crops expands along the Peruvian coast, in the departments of La Libertad, Lima, Ica, Ancash and Lambayeque. Currently, the released cultivars are losing their resistance or tolerance to pests and diseases, forcing to plant breeders to generate new cultivars that respond to these new challenges. The first action of the breeder is to generate genetic variation in the population. This technique helps to increase genetic variability, it is achieved and selected genotypes with tolerance and / or resistance to biotic and abiotic stresses. The case was taken to the PIPS in Cereals and Native Crops of La Molina National Agrarian University. Three genotypes were evaluated: UC157F1, UC115 and 2H-38H. The seeds were submerged in the following treatments: water and phosphate buffer at pH 3 as control and 1mM, 3mM, 5mM, 7mM and 9mM sodium azides for one hour and sowed in plates and pots (100 per replication) under RBD design with factorial arrangement and 4 replications were used. The studied variables were: germination, survival, plant length, root length, plumule/radicle length ratio, germination weight, seedling and root elongation speed and germination weight gain, LD₅₀ and the average effect of the mutagenic agent. During the analysis of the variables there were significant differences. The genotypes had different response to the sodium azide, being the UC157F1 cultivar the most chemo-sensitive and 9mM showed the high effect.

Keywords: Asparagus, genotypes, mutagenic agent, sodium azide

I. INTRODUCCIÓN

El Perú es considerado como un país megadiverso, tanto en fauna como en flora. El recurso flora se utiliza para diversos propósitos tales como: alimentación, agro-industrial, medicinal etc. Dentro de la variedad de cultivos, el espárrago (*Asparagus officinalis* L.) es la única especie, dentro su género, que es para propósitos comestibles.

En el Perú, este cultivo se siembra en la zona central de la costa peruana, dentro de los departamentos de La libertad, Ica, Lima, Ancash y Lambayeque. En La Libertad, en el 2015, tuvo una producción del 50% del total, seguido por el departamento de Ica con el 39%, Lima con el 5% y Ancash con el 3% y Lambayeque con el 1% (La Republica, 2015). En relación a la exportación, su producción en fresco y conserva está dirigida a Estados Unidos, Francia y España (La Republica, 2015).

El espárrago se propaga por semilla o por arañas (porción de la corona del espárrago), ambos órganos presentan ciertos inconvenientes a nivel de campo. La primera es genética; basada en la segregación independiente de gametos, a través de la polinización cruzada generando semillas con genotipos variables y la segunda por la baja tasa de multiplicación y fácil diseminación de plagas y enfermedades a nivel radicular.

Lo mencionado anteriormente, apoya el hecho de trabajar en este cultivo con el objetivo de crear, generar y promover un manejo más eficiente y eficaz, que incrementen el rendimiento, producción y calidad de esta hortaliza, aplicando metodologías en manejo integrado y de mejoramiento genético para la obtención de nuevos cultivares adaptables al medio (resistentes a factores bióticos y abióticos). Una alternativa que ayude en la búsqueda de los genotipos genéticamente más estables al ambiente que nos rodea seria la metodología de inducción de mutaciones.

OBJETIVOS

Objetivo principal

Determinar el efecto que ocasiona la azida de sodio (NaN_3) a las semillas y plántulas de espárrago (*Asparagus officinalis* L.) de los cultivares UC 157 F1 y UC 115 y la línea 2H-38H.

Objetivos específicos

Determinar la respuesta que ocasiona la azida de sodio en los cultivares de espárrago (*Asparagus officinalis* L.) UC 157 F1 y UC115 y la línea 2H-38H.

Determinar la dosis adecuada de azida de sodio que ocasione cambios fisiológicos y en menor intensidad los morfológicos en los cultivares de espárragos UC 157 F1, UC 115 y la línea 2H-38H

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 CULTIVO DE ESPÁRRAGO

2.1.1 GENERALIDADES

El espárrago es un monocotiledonea perteneciente a la familia Asparagaceae, al género *Asparagus* que comprende aproximadamente 300 especies. La especie de interés alimenticio y/o medicinal es *Asparagus officinalis* (Wien, 1997; Stajner *et al.*, 2002; Güvenc y koyuncu, 2002; Moreno *et al.*, 2012). Esta hortaliza es de ciclo de vida perenne, con vida útil de 15 años (Pontaroli, 2005; Londoño, 2005), se cultiva particularmente en clima templado y subtropical (Parody, 1978). La parte comestible en esta hortaliza es el turión, que viene ser el tallo con hojas reducidas a escamas (Rubatzky y Yamaguchi, 1997). Estas estructuras emergen a inicios de primavera y se cosecha entre los 40 a 60 días después de la brotación (Pontaroli, 2005). Los turiones tienen una constitución apical compleja. Contiene en su interior los primordios de hojas, yemas laterales y flores. Las yemas laterales una vez diferenciadas presentan unas estructuras de forma acicular conocidas como cladiolos, cuya función es fotosintética (Marziani *et al.*, 1999). La estructura perenne del espárrago es la corona, que está constituida por raíces adventicias carnosas, cuya función es de almacenamiento y que crecen a partir de un tallo subterráneo conocido como rizoma simpodial (Blasberg, 1932; Ornstrup, 1997). A partir de las yemas del tallo simpodial se originan los turiones y las raíces adventicias (Robb, 1984), que crecen año tras año.

Dentro del ámbito reproductivo el cultivo de espárrago es considerado una planta "dioica"; sin embargo, también se observan flores con ambos órganos presentes, que producen semillas viables (Bozzini, 1959). En el estado vegetativo no se observa dimorfismo sexual; sin embargo, las plantas estaminadas suelen ser las vigorosas, precoces y más productivas en cuanto al número de turiones; mientras que las pistiladas no (Jamsari, 2004).

2.1.2 UBICACIÓN TAXONÓMICA

De acuerdo a Grayum (2003), el espárrago presenta la siguiente ubicación taxonómica:

Reino:	Plantae
Subreino:	Tracheobionta
División:	Magnoliophyta
Clase:	Liliopsida
Orden:	Asparagales
Familia:	Asparagaceae
Subfamilia:	Asparagoideae
Género:	Asparagus
Especie:	Asparagus officinalis L.

2.1.3 ORIGEN E IMPORTANCIA EN EL PERÚ

El espárrago (*Asparagus officinalis* L.) es originario del Mediterráneo, entre las cuencas de los ríos Tigris y Eufrates y fue consumido por los antiguos Egipcios y Griegos (Moreno *et al.*, 2012). Esta hortaliza fue introducida en España por los romanos, durante el periodo de la invasión. A partir del siglo XVIII, esta hortaliza se convirtió en la preferida por la burguesía, y es hasta el siglo XIX se consume como espárrago verde, existiendo después de ello en el mercado dos tipos de espárrago: el verde y blanco (Prohens *et al.*, 2008).

El cultivo del espárrago en el Perú se inició a principios de la década de los 50, en el Departamento de La Libertad, con el cultivar "Mary Washington", como espárrago blanco en conserva. Pero es a partir de la década de los 80 cuando el espárrago cuenta con notable crecimiento sostenido por la Asociación de Productores de ICA, iniciando en el año de 1986 el Programa de Producción de Espárrago Verde, para la exportación turiones frescos del cultivar UC 157 F1 bajo tecnología californiana, facilitando la realización en el estudio del crecimiento y desarrollo de esta hortaliza en el país y la visita de dos expertos peruanos a las zonas productoras de espárrago en los Estados Unidos (Alzamora, 2006).

2.1.4 ENFERMEDADES Y PLAGAS

El cultivo de espárrago presenta problemas durante su manejo y producción ocasionados en su mayoría por el componente ambiental. Este componente está compuesto del factor clima, suelo y fitosanitario (Hasegawa *et al.*, 1973; Yang y Clore, 1973), por lo tanto la selección del cultivar es fundamental; debido a que este cultivo permanece 10 años en campo (González, 1999). Por otro lado el mantenimiento de un cultivo sano y homogéneo es fundamental para maximizar su longevidad y de este modo aumentar la rentabilidad del sistema. Por último dentro del estado vegetativo se ha observado que las plantas pistiladas son menos resistentes que las plantas estaminadas (Ellison, 1986).

2.1.4.1 ENFERMEDADES

- ***Fusarium oxysporum***

Las especies fitopatógenas del género *Fusarium* ocasionan una de las enfermedades más importantes en el cultivo de espárrago a nivel mundial (De La Rosa, 1998; Endo y Burkholder, 1971; Schreuder and Lamprecht, 1995). El fitopatógeno *Fusarium oxysporum*, es una especie que se comporta como saprofitos (Armstrong y Armstrong, 1981), invadiendo a la planta durante su primera etapa de crecimiento (emergencia), ingresando al huésped a través de las heridas o por los estomas, considerándolo como parásito débil (Olivain y Alabouvette, 1997).

Este patógeno es considerado generalista, por que ataca a diferentes familias, sin embargo, cada especie es afectada por su forma especial de *Fusarium oxysporum* como por ejemplo la conocida como f.sp. asparagi. La forma especial f.sp. asparagi es considerada como un factor limitante en la producción del espárrago, presentándose en todas las zonas donde se cultiva esta especie (Dan y Stephens, 1995). Las razones de su diseminación en campo son dos: la capacidad de colonizar una amplia gama de sustratos y el eficiente mecanismo para dispersarse en el tiempo y espacio (Nelson *et al.*, 1991; Agrios, 1996).

- ***Stemphylium vesicarium***

Stemphylium vesicarium se encuentra distribuida en todas las zonas productoras de espárrago, causando problema durante los meses de invierno en la zona de Viru y los valles de Chíncha, Cañete y Huaral (Bayer, 2011).

Este patógeno produce manchas ovaladas con un halo rojizo en los tallos de apariencia aceitosa. En turiones, los daños ocasionados están asociados a partículas de arena arrastradas por el viento, causando lesiones en la mitad inferior de la planta (Agrios, 1996).

- ***Puccinia asparagi***

Puccinia asparagi es un fitopatógeno que se encuentra distribuido en todas las zonas productoras de espárrago del Perú. En 1995 se tuvo el primer reporte de ataque en la zona de Viru. El mayor daño causado por la roya del espárrago, se produce en fase de secado, debido a la reducción en la translocación de carbohidratos hacia la corona, siendo mayor a inicios de brotación (Bayer, 2011).

- ***Cercospora asparagi***

Cercospora asparagi inicialmente causaba daños en los valles costeros del Perú, llegando a desplazar a la roya del espárrago. *Cercospora* causa manchas necróticas ovales y de tamaño diferente en el follaje (cladiolo, ramas y tallos). En presencia de alta humedad relativa, estas manchas van acompañadas de puntos oscuros en medio de estas lesiones. En ataque severo pueden arrasarse con la plantación causando defoliación y marchites. El fitopatógeno puede permanecer e infectar la broza constituyendo una fuente de inóculo importante debido a que *Cercospora* puede producir los conidioforos y las conidias en el follaje que ha sido chapodado (Bayer, 2011).

2.1.4.2 PLAGAS

- ***Heliothis virescens***

Heliothis virescens es un lepidóptero que ataca a diversos cultivos, entre ellos: garbanzo y algodón. En el espárrago, esta plaga, es importante porque devora el follaje, raspando la corteza de los tallos, alterando o evitando la formación y transporte de nutrientes del follaje a la corona, reduciendo así la producción de turiones de la siguiente campaña (Sparks, 1981).

- ***Euchistus convergens***

Euchistus convergens, es un chinche de la familia Pentatomidae. Este insecto pica y succiona la sabia, causando al inicio amarillamiento, luego marchites dejando finalmente la rama seca.

En la zona de la picadura se observan secreciones azucaradas, que propician la aparición del hongo de la fumagina (Bayer, 2011).

- ***Tetranychus urticae***

Tetranychus urticae es una de las plagas que más problemas ha causado en la agricultura (Flexner, 1995), distribuyéndose en todas las zonas a nivel del globo y más en las zonas templadas. Si no se toma las medidas adecuadas puede ocasionar en el espárrago, como en otras hortalizas y frutales deshidratación excesiva (Goodwin, 1995). En los últimos años esta especie ha demostrado resistencia por los acaricidas de reciente liberación, como es el caso de las abamectinas (Campos *et al.*, 1995).

- ***Prodiplosis longifila***

Prodiplosis longifila es una plaga polífaga, que ataca a un gran número de cultivos localizados en las zonas bajas de los valles de la costa central. Su importancia en los últimos años radica en el uso indiscriminado de pesticidas que reprimen a los controladores biológicos, principalmente a sus respectivos predadores. Este insecto daña los brotes apicales, raspando los turiones provocando su malformación y pérdida de la calidad comercial (Bayer, 2011).

- ***Copitarsia incomoda***

Copitarsia incomoda es considerada una plaga polífaga, encontrándose desde México hasta Sudamérica (Angulo y Weigert, 1975), atacando a diversas especies cultivadas. Esta plaga es considerada cuarentenaria, provocando problemas en la comercialización de diversas especies en el extranjero (USDA, 2003).

En el cultivo de espárrago, se considera plaga clave por sus hábitos alimenticios, barrenando los tallos, evitando la translocación de nutrientes del follaje a la corona y con ello la producción de turiones de la siguiente campaña (Bayer, 2011).

2.1.5 CULTIVARES

De acuerdo al Ing. Garcilazo Cornejo, en su entrevista sobre este cultivo por la revista "FRESH PLAZA" en el 2008, los cultivares de espárrago que abarcan mayor producción en el Perú son:

2.1.5.1. UC 157 F1

La "UC 157 F1" es un híbrido clonal que fue lanzado en 1975 y que hasta la fecha se ha convertido en el cultivar de espárrago predominante en California y en otras partes del mundo. Este cultivar produce turiones verdes con escamas, yemas comprimidas y punta cónica. Los turiones de diámetro mediano son uniformes, con una sección transversal redonda y además presenta alto grado de tolerancia a Fusarium y una tolerancia moderada a la roya.

2.1.5.2. ATLAS

El cultivar "ATLAS" es un Híbrido doble con amplia adaptabilidad, excelente rendimiento en verde con cabezas compactas y tallos medianos a largos con peso promedio de 28 gr. y además son altamente tolerante a Fusarium y Roya.

2.1.5.3. IDA LEA

El cultivar "IDA LEA" presenta turiones totalmente verdes, con una altura mayor a la "UC 157 F1" en un 10% a 20 %. Una de las características que distingue este cultivar de las otras es su capacidad de mantener una cabeza estrecha, bien afilados bajo condiciones climáticas calientes. En condiciones primaverales el tallo no ramifica hasta tener una altura de 12 centímetros. La característica antes mencionada, es deseable para condiciones de climas cálidos.

2.1.6 PROPAGACIÓN

2.1.6.1 PROPAGACIÓN VEGETATIVA

La propagación vegetativa, es una estrategia que el hombre ha utilizado para domesticar las plantas para su uso alimenticio, comercial, industrial, medicinal, etc. En el espárrago existen múltiples formas de incrementar el número de plantas a partir del material parental. A nivel de campo la multiplicación vegetativa presenta dos alternativas: arañas y/o plántulas en

camellón (Castagnino *et al.*, 2011). En la propagación por arañas, el sistema radicular en formación se encuentra reducido (krarup y Herrera, 1987). Dicha etapa es importante y crítica, ya que los errores en esta fase pueden repercutir en el ciclo de vida de la plantación, por lo tanto lo ideal es la selección de un buen material (Montanari, 1996). Por otro lado la propagación por plantines puede entrar a campo definitivo a los 70 a 100 días después de la siembra, optimizando el costo de la semilla (Castagnino *et al.*, 2013); sin embargo la desventaja es el escaso sistema radicular en un espacio limitado y la necesidad de mayores requerimientos hídricos durante el primer año. La escasa cabellera radicular le confiere a la planta un estrés físico, manifestándose fenotípicamente a través de la disminución del crecimiento y en la deformación del área radicular y foliar (Mugnai, 1998), impactando en el rendimiento futuro de la plantación. Para ambos sistemas de propagación *in vivo*, los genetistas están trabajando en la incorporación de genes de resistencia a estreses generados por *fusarium* sp. a través del cruzamiento interespecífico entre *Asparagus officinalis* x *Asparagus amaraus* y *Asparagus officinalis* x *Asparagus acutifolius* (Falavigna, 2001). Existen otras formas de propagación basadas en técnicas de las cuales se emplean otros propágulos vegetativos para obtener clones o híbridos de espárrago, que se encuentran dentro de las técnicas de micropropagación *in vitro*.

2.1.6.2 MICROPROPAGACIÓN IN VITRO.

La micropropagación *in vitro* es una técnica que contribuye a la reducción del ciclo generacional, que parte desde la siembra del explante (sea célula, tejido u órgano), hasta la formación de planta completa (Cravero *et al.*, 2007).

La micropropagación clonal en espárrago se obtiene a través del cultivo de meristemo y de secciones nodales con yemas axilares. Los tipos de micropropagación antes mencionados tiene la desventaja de ser lentas e ineficientes y no válidos para todos los genotipos.

El cultivo de meristemo en esta especie fue propuesto por Murashige *et al.* (1972) y Hasegawa *et al.* (1973), obteniendo un protocolo de buenas expectativas, pero con dificultades durante su proceso. Posteriormente Yang y Clore (1973) desarrollaron un protocolo de micropropagación a partir de yemas laterales hasta la obtención de brotes laterales. Trabajos futuros se encargaron de mejorar y refinar los diversos aspectos durante los procesos de micropropagación, así como la adición de sacarosa al medio (Chin, 1982;

Desjardins, 1984 y Doré, 1988), además afirma estos autores que la adición de retardantes contribuye a la formación de raíces. Por otro lado se ha probado la multiplicación *in vitro* con otros tipos de explantes (filocladios, zona internodal, etc.), obteniendo protocolos ineficientes, para su uso comercial (Benmoussa *et al.*, 1997; Bojnauth *et al.*, 2003). La causa de estos eventos radica en el desafío de formar la corona y raíces funcionales a partir del explante (Shigeta *et al.*, 1990).

2.1.7 VARIACIÓN SOMACLONAL EN ESPÁRRAGO

En el cultivo de espárrago, la obtención de genotipos resistentes de forma convencional se complica por la coevolución fitopatogeno-planta y el ciclo de vida (perenne); además la resistencia a enfermedades compromete más de un gen de resistencia (Lassaga *et al.*, 1998). La aplicación de las técnicas de selección *in vitro*, ha facilitado la obtención de genotipos mutantes resistentes a enfermedades entre otros (Crino, 1997; Remotti, 1998). Todas estas técnicas, utilizan la variación somaclonal para la detección de mutantes o variantes genotípicas (Larkin y Scowcroft, 1981). Además muchos autores afirman que las mutación a nivel *in vitro* se deben al efecto directo e indirecto del 2,4 D, al estrés oxidativo, los cambio en los patrones de metilación del ADN entre otros factores (Pontaroli y Camadro, 2005). En el espárrago, este fenómeno se ha considerado como no deseado, por generar variación como por ejemplo:

- Chang y Hung (1982), reportaron que a partir de callos obtuvieron plantas con flores aberrantes de mayor tamaño y follaje glauco en flores terminales en el cultivar UC 309.
- Camadro (1992), reporta variantes somaclonales en *Asparagus officinalis*, *Asparagus densiflorus* y *Asparagus plumosus*, cuya característica es de presentar microsporas con número cromosómico no reducido ($2n$), teniendo su origen en la transposición, escisión o inserción de genes que participan en el proceso de la meiosis (Chen *et al.*, 2002)
- Kunitake *et al.* (1998), observaron niveles de ploidía y variaciones morfológicas.
- Raimondi *et al.* (2001), utilizaron un enfoque similar a Kunitake, junto con el análisis meiótico y la técnica asistida por marcadores moleculares RAPD, caracterizando genotipos somaclonales regenerados por embriogénesis somática.

Aquí tenemos un ejemplo donde se utiliza la variación somaclonal en la técnica de suspensión celular con el objetivo de obtener genotipos mutantes resistentes a herbicidas:

- Dharshni (1999), a través de la técnica de suspensión celular quiso identificar mutantes resistentes al herbicida Chlorsulfuron para el genotipo de CRD en espárrago, obteniendo resultados satisfactorios. Los resultados apuntaron a la selección de las colonias sometidas a 8 nM de Chlorsulfuron, seleccionando de una población de 50 millones de células 43 variantes resistentes, de donde solo 34 pasaron a la fase de regeneración (exento del herbicida en el medio de cultivo) obteniéndose en total 36 plantas completas a los 11 meses.

2.2 INDUCCIÓN DE MUTACIONES

En los programas de mejoramiento genético, el primer objetivo es la generación de variabilidad genética. Las técnicas de carácter convencional apoyadas en la polinización cruzada natural y artificial genera variabilidad genética por medio del fenómeno de recombinación genética (Mroginski, 2004; Suarez, 2006), sin embargo estas técnicas demandan tiempo en el cumplimiento de los objetivos. Por otro lado existe una alternativa que puede ser empleada tanto en semillas como en propágulos vegetativos; esta técnica es conocida como inducción de mutaciones.

De acuerdo a Novak y Brunner (1992) la inducción de mutaciones es una técnica útil en los programas de mejoramiento genético así como en las investigaciones fuera de este rubro. Esta técnica tuvo su aplicación a partir de la década de los años 20, con el objetivo de incrementar la variabilidad y con ello tener una rápida y eficiente selección de los caracteres morfológicos y fisiológicos que contribuyan al incremento de la productividad de las cosechas.

2.2.1 DEFINICIÓN.

Las mutaciones tuvieron su primera connotación por De Vries en 1901, definiéndola como cualquier cambio ocurrido en la descendencia en la que no hayan intervenido los fenómenos de segregación y recombinación; sin embargo este concepto revoluciona cuando se descubre que el material genético es el ADN, sumado a la propuesta por Watson y Crick en 1953, indicando que esta molécula tiene forma de cadena de doble hélice, que cada eslabón representa a un nucleótido; con estos descubrimientos se definió a la mutación como un

cambio en la secuencia de nucleótidos del ADN. Este concepto se ha estado afinado con el objetivo de entender este fenómeno, incorporando otros términos a la definición, como por ejemplo lo que indican Bertram (2000), Aminetzach *et al.* (2005) y Burrus y Waldor (2004), refiriéndose a la mutación como un cambio en la secuencia de nucleótidos del genoma de un organismo, virus o ADN extracromosomal u otro elemento genético, resultado del daño en el ADN, el cual no puede ser reparado y cuyos errores se siguen manteniendo durante y después del proceso de replicación del ADN.

2.2.2 TIPOS DE MUTACIONES

Con lo abordado en los párrafos anteriores, la mutación se puede obtener a través de la exposición del material a un agente externo que puede ser natural o manipulado por el hombre capaz de modificar su comportamiento fenotípico mediante la alteración del ADN. Estos agentes pueden alterar el ADN a lo largo del tiempo (miles de años) o de forma rápida (en cuestión de minutos u horas), es por ello que las mutaciones dentro de lo descrito en este párrafo se puede dividir de dos formas: espontáneas e inducidas.

2.2.2.1 MUTACIONES ESPONTÁNEAS

Las mutaciones espontáneas son aquellas que ocurren en la naturaleza, causado por un proceso de selección en base a la exposición al ambiente, puede ocurrir en un individuo o conjunto de individuos. El inicio de las observaciones y anotaciones científicas se dio con Darwin, al reconocer que los individuos presentaban variaciones fenotípicas que ocurrían de forma aleatoria; sin embargo, en estudios posteriores atribuyeron estas variaciones a las mutaciones.

Este tipo de mutaciones de acuerdo a Bertram (2000) y Aminetzach *et al.* (2005) señalaron que constantemente ocurren en los individuos a causa de la constante exposición a los agentes estresantes que los rodean (seres bióticos y abióticos), con la finalidad de poder adaptarse al nuevo ambiente. De acuerdo a Cubero (2003) la tasa de inducción espontánea puede oscilar entre 10^{-8} a 10^{-6} en microorganismos y entre 10^{-6} a 10^{-4} en plantas y animales.

2.2.2.2 MUTACIONES INDUCIDAS

Las mutaciones inducidas de acuerdo a Salaz (2015), son aquellas provocadas por la acción de un agente mutagénico. Novak y Brunner (1992), la resaltan como una metodología útil para los programas de mejoramiento genético, a su vez Mikaelson (1980), señala que las

mutaciones son utilizadas para generar variabilidad genética y para después seleccionar nuevos cultivares. Además Novak y Brunner (1992) manifiestan que la ventaja de esta técnica en relación a las otras es la obtención de genotipos con alteraciones en los genes.

2.2.3 TIPOS DE AGENTE MUTAGÉNICO

Los agentes mutagénicos son muy utilizados para la generación de variabilidad (Predieri y Zimmerman, 2001); sin embargo la tasa de variabilidad depende de la dosis de aplicación (Gaul y Frimmel, 1972). Estos agentes provocan daño generalmente a nivel fisiológico y genético (Sahasrabudhe *et al.*, 1991); así mismo, Huari (2013) señala que los investigadores dentro de los programas de mejoramiento buscan que los agentes mutagénicos alteren en menor medida rasgos fisiológico, pero si en gran medida los genéticos. Dentro de lo genético Moh y Nilan (1956) sugieren que las mutaciones provocadas se encuentran correlacionadas en demasía con las aberraciones cromosómicas tales como deficiencias pequeñas o duplicaciones. Los agentes mutagénicos se dividen en: físicos y químicos (Kozak *et al.*, 1975).

2.2.3.1 AGENTES MUTAGÉNICOS FÍSICOS

Los agentes físicos de acuerdo a Estrada-Basaldua *et al.* (2011) se subdividen en ionizantes y no ionizantes como los rayos x, gamma, beta, alpha, neutrones, protones y rayos ultravioletas, siendo estos últimos los de mayor eficacia dentro de los inductores físicos. Es importante durante la práctica investigar la dosis aplicada y su correlación con la supervivencia del material bajo estudio, en otras palabras descubrir la dosis letal que me permita tener un amplio espectro de mutaciones dentro de la inducción de una muestra y con ella obtener mutantes útiles (Donini y Sonnio, 1998).

La radio sensibilidad varía con la especie, el cultivar, la manipulación y el estado fisiológico de la planta u órgano antes y después de la irradiación (Briggs y Constantin, 1977). Los daños ocasionados principalmente son aberraciones cromosómicas, debidas a la ionización y excitación de ADN que se muestra a través de la condensación de los cromosomas que no han sido al 100% reparadas, causando daños se pueden visualizar durante la metafase (Cardone *et al.*, 2010). A un nivel celular se ha demostrado que los agentes físicos estimulan la actividad metabólica de las plantas, como la respiración, glicolisis, la actividad de la enzima catalasa y la fosforilación oxidativa (Rekha y Langer, 2007).

2.2.3.2 AGENTE MUTAGÉNICOS QUÍMICOS

Los agentes químicos empleados en la inducción de mutaciones dentro de los programas de mejoramiento genético de acuerdo a Fita *et al.* (2008) son: el etil metan sulfonato, dietil sulfonato, azida sódica, etil inina y colchicina. Estos agentes pueden alterar la constitución del genoma de diversos modos, por ejemplo los suscitados por Sardina (2007) el cual señala que son tres los modos de actuar: los que se incorporan al ADN durante la replicación en vez de las bases oficiales (G, C, T y A) como es el caso de la 6 amino purina; por otro lado los que se insertan entre dos pares de bases separándolas entre si durante la replicación, presentándose una conformación anormal conocida como microinserción o microdelección; y por último los que reaccionan con el ADN que no está en proceso de replicación, ocasionando cambios en las bases en el momento de la replicación como el ácido nitroso, la hidroxalanina y los agentes alquilantes. Los investigadores, de acuerdo a sus indagaciones, señalan que los agentes químicos son más efectivos que los físicos (Dhamayanthi y Reddy, 2000; Bhat *et al.*, 2005; Rao y Rao, 1983; Kumar, 1998), además se reporta que estos agentes realizan e incrementan la variabilidad genética de los cultivos (Mashenkov, 1986; Ricardo y Ando, 1998) a nivel de programas de mejoramiento genético sexual y asexual (Kleinhofs *et al.*, 1978). Para finalizar dentro de la lista de agentes químicos, la azida de sodio (NaN_3) es una de las más usadas y reportadas por los investigadores en el mejoramiento genético (Rines, 1985; Veleminsky y Anglis, 1987; Owais y Kleinhofs, 1988; Raicu y Mixich, 1992 y Grant y Salamone, 1994).

2.2.4 INDUCCIÓN DE MUTACIONES DE ACUERDO AL TIPO DE REPRODUCCIÓN

La inducción de mutaciones es una herramienta muy utilizada en los programas de mejoramiento genético; con el fin de incrementar la variabilidad genética, brindando al investigador nuevas alternativas o atributos de acuerdo a los objetivos trazados (Micke, 1999; Gutierrez *et al.*, 2003). Por otro lado Lawrence (1965) señala que la inducción de mutaciones obtenida tanto por mutágenos físicos o químicos, depende de distintos factores, y de los cuales se dividen en dos grupos: el primero relacionado con el número de mutaciones útiles producidas (eficiencia del agente mutagénico, eficiencia del uso de la mutación y la forma como se descubre la mutación) y el segundo que trata acerca de los factores asociados con la naturaleza de la variación inducida.

La inducción de mutaciones suele tener los mismos objetivos en los tres tipos de reproducción; sin embargo los trayectos siguen diferentes directrices.

2.2.4.1 EN ESPECIES AUTÓGAMAS

Los programas de mejoramiento que trabajan con las especies de este tipo de reproducción, emplean la técnica de inducción de mutaciones de la siguiente manera:

- a) Uso para la mejora de variedades.
 - b) Mediante cruzas con plantas mutantes.
- Cruza del mutante con la línea parental.
 - Cruza de diferentes mutantes con diferentes líneas parentales.
 - Cruza del mutante con una línea parental diferente.
 - Cruza de dos mutantes que aparentemente llevan el mismo gen mutante.

Un claro ejemplo del uso de la técnica de inducción de mutaciones en los programa de mejoramiento de plantas autogamas; lo realiza Brasil en trigo (Osorio, 1972). A partir del año 1960, se pone en práctica esta técnica con el objetivo de encontrar genotipos resistentes a la roya del tallo, trabajando inicialmente con tres variedades: Frontana, IAS 13-Passo Fundo e IAS 20-Iassul, exponiéndolas a dosis de 10, 20 y 30 kR. De acuerdo a Silva y Marinho (1962) solo encontraron en la variedad IAS 20-Iassul, mutantes más productivos y resistentes a la roya del tallo a su vez se encontró que esta resistencia era expresada por el gen Sr 5, no encontrándose en el cultivar irradiado. La descendencia del cruzamiento entre los genotipos resistentes se seleccionó dos líneas en la cosecha de 1969, rindieron 15% y 13% más que la variedad original (IAS 20-Iassul).

2.2.4.2 EN ESPECIES ALÓGAMAS

El inducir mutaciones en especies alógamas, ofrece menos perspectivas, particularmente porque el objetivo es expresar los alelos recesivos; sin embargo, la mayoría de los rasgos fenotípicos se encuentra expresados por el alelo dominante; pero Donini y Sonnino (1998) reportan trabajos de mejoramiento genético en plantas de reproducción alogama exitosos utilizando la inducción de mutaciones.

En México Rubí *et al.* (1995), buscaban encontrar a través de la inducción de mutaciones, genotipos enanos de palto. Para este trabajo utilizó los cultivares Fuerte y Colín V-33 y las selecciones Colinmex, 39 PMe, 137 PLS, 175 PLS y Colín 101. Para el objetivo (plantas enanas) se utilizó el material genético que sobrevivió a las dosis de 25 Gy y fueron evaluados por 5 años. Durante el transcurso de la investigación se reportaron plantas recuperadas (De La Cruz *et al.*, 1994); por tal razón de debe evaluar las generaciones siguientes para comprobar la estabilidad o pérdida de la característica objetivo (Donini y Sonnio, 1998). En conclusión se observaron individuos del 39 PMe y 137 PLS de porte bajo con una circunferencia del tallo mayor a los demás; por otro lado en relación a la característica de longitud de brote y número de entrenudos, los individuos provenientes de Colinmex, 39 PMe, 137 PLS, Colín V-101, presentaron una reducción en la longitud de los entrenudos, atribuyéndolo al efecto de la irradiación gama. Zagaya y Przybila (1976) confirman que los efectos de los rayos gamma se centran en la reducción de los entrenudos, lo cual origina variantes compactas.

2.2.4.3 EN ESPECIES DE REPRODUCCIÓN ASEXUAL

En los programas de mejoramiento asexual, las especies se sitúan en dos categorías: la primera aquellas que puede reproducir sexualmente; pero se propagan para su venta a partir de semilla vegetativa, cuya razón se asienta en que estas plantas generalmente son heterocigotas, aneuploides o poliploides y la segunda se centra en las especies propagadas vegetativamente, denominadas apomícticas (Heros, 1999). Por ejemplo en el banano, Novak y Brunner (1992) señalan que el mejoramiento genético basados en las técnicas tradicionales de reproducción, hacen que la poca variabilidad y esterilidad limiten el programa, es por ello que ambos resaltan a la inducción de mutaciones como una alternativa clave para incrementar la variabilidad y con ello conseguir genotipos con una mejor configuración morfológica y a su vez sean resistentes a los estreses bióticos y abióticos.

2.3 AZIDA DE SODIO

2.3.1 GENERALIDADES

La azida de sodio (NaN_3) es utilizada como bactericida, pesticida y en la producción de gas de nitrógeno como soporte en las bolsas de autos para la protección en casos de accidentes (Kleinhofs *et al.*, 1978), además Salaz (2015) afirma que su presentación es en forma de cristales de color blanco con una densidad de 1.85 g/cm³, pudiendo ser explosivo

a una temperatura de 275 °C; por otro lado Bräse *et al.* (2005) afirman que este compuesto puede reaccionar intensamente con el bromuro, ácido nítrico, dimetil sulfato y una serie de compuestos pesados.

2.3.2 CONDICIONES DE USO COMO MUTAGÉNICO

Según Van Harlen (1998) el agente mutagénico para usarse como tal, se debería tener en cuenta lo siguiente:

- La dosis y la cantidad de mutágeno de acuerdo al tamaño del individuo y muestra a exponer.
- El pH del medio en el que se desenvolverá el agente mutagénico.
- Interacción entre los componentes del medio de cultivo (bajo condiciones *in vitro*).
- La permeabilidad de la semilla y en caso de condiciones *in vitro* el tipo de explante a tratar.
- Condiciones post tratamiento.

Para el caso de la azida de sodio Khan *et al.* (2009) indican que existen muchos reportes a acerca de los factores que pueden modificar el comportamiento de este mutágeno a las semillas, y estos son: el tiempo de exposiciones, temperatura de la semilla y el pH del medio.

2.3.2.1 TIEMPO DE EXPOSICIÓN

El tiempo de exposición de la azida de sodio aplicados al material depende mucho de la permeabilidad y vigor de las semillas (Al-Qurainy, 2009), es por ello que los tiempos a nivel de especies en diferente como por ejemplo Ali *et al.* (2014) exponen las semillas de lentejas de dos variedades (L4147 y L4594) a un remojo por 12 horas a tres concentraciones de azida (0.1%, 0.3% y 0.5%), obteniendo un descenso del porcentaje de germinación a medida que la dosis incrementa. Por otro lado Olsen *et al.* (1993), señalado por Ole *et al.* (1993), recomiendan que para inducir las semillas de cebadas, lo ideal es remojarlas por 12 horas en la solución de azida de sodio.

2.3.2.2 EFECTO DEL pH

De acuerdo a Nilan *et al.* (1973), el factor pH es fundamental para que el metabolito pueda actuar dentro de la célula, afirmando que alrededor del pH 3 existe la seguridad de una mejor

penetración de la membrana citoplasmática. Así mismo Ole *et al.* (1993) afirman que trabajando con este agente mutagénico a pH 3 a una concentración de 1mM y 0.39% de NaN₃ obtuvieron fenómenos de transición de adenina a timina y guanina a citosina en cebada y maní con alto contenido de aceite respectivamente.

2.3.2.3 TEMPERATURA

La temperatura en la fase de germinación es importante, apoyando en la activación del crecimiento y desarrollo de la planta a partir de semilla (Fernandez y Johnston, 2006). Una vez activa la semilla es susceptible a cualquier tipo de estrés y con ello a sufrir cambios que puedan alterar con comportamiento genético; como los ocasionados por la azida de sodio. Animasaun *et al.* (2014) trabajando en maní con las variedades SAMNUT 10 Y SAMNUT 20, sometieron las semillas a una temperatura de 25°C por 12 horas de forma intermitente, para activar la semilla e incrementar la eficiencia del agente mutagénico. Kumar y Dwivedi (2013), someten las semillas de *Brassica campestris* L. a diferentes dosis de azida de sodio (0.3%, 0.5% y 0.7%) remojándolas en la solución por 6 horas a una temperatura de 26 +/- 2°C en agitación.

2.3.3 DOSIMETRÍA

La dosimetría se define como la cantidad del agente mutagénico que es absorbido por el material vegetal como resultado de la exposición a este (Cubero, 2003). Una de las dificultades dentro de la determinación de la dosimetría es el deterioro del material a medida que incrementa la dosis, ocasionando la disminución de la frecuencia de mutaciones económicamente útiles (Navak y Brunner, 1992).

La dosimetría está determinada por varios factores entre ellos tenemos: la especie, el cultivar, las condiciones fisiológicas del material vegetal y la manipulación del material antes y después del tratamiento mutagénico; es por ello que su determinación suele ser muy específica (Salim *et al.*, 2009).

2.3.4 EFECTO EN LAS PLANTAS

La azida de sodio (NaN₃), es uno de los agentes mutagénicos que se utiliza en los programas de mejoramiento, para generar la variabilidad. La azida de sodio (promutagénico) en la célula es metabolizada hasta convertirse en L-azidoalanina. En estudios anteriores se ha demostrado tener un efecto al sustituir bases nitrogenadas en *Salmonella*

typhimurium (Owais *et al.*, 1978 y Shelton *et al.*, 1994). Los estudios en plantas reportan que ocasionan aberraciones cromosómicas en *Hordeum vulgare* (Sideris *et al.*, 1973, Sideris y Argyrakis, 1974; Sander *et al.*, 1978; Veleminský y Angelis, 1987), así mismos, en el género *Pisum* se ha demostrado una eficiente capacidad mutagénica en comparación con los agentes físicos (Sander y Muehlbauer, 1977). Campos y Colleto (1999) y Kanaya *et al.* (1994) afirman, que la azida de sodio actúa de diferentes modos dependiendo de la especie; es posible que este comportamiento se deba a su poca estabilidad en solución, es por ello que todas las investigaciones que hasta la fecha se realizan reflejan comportamientos ambiguos o distintos.

2.3.4.1 EFECTOS GENÉTICOS

De acuerdo a Van Harlem (1998), la azida de sodio genera deleciones de punto en el material genético. Olsen *et al.* (1993), en cebada, identificaron degeneraciones en la secuencia de pares de bases del gen ant18 que expresa la formación de antocianinas; obteniendo una sustitución de 21 bases nitrogenadas, correspondiendo al 0.17% del total de nucleótidos secuenciados (12 704). De esta sustitución, el 86% fueron por transición de nucleótidos y los 14% restantes fueron por transversiones.

2.3.4.2 EFECTOS FISIOLÓGICOS

Tal como señalan Shu *et al.* (2012), la azida de sodio no solo genera cambio genéticos, sino también cambios fisiológicos al inhibir diferentes actividades y el ciclo celular. Gruszka *et al.* (2012), Señalan que los efectos en la fisiología son numerosas, inactivando la acción de la enzima catalasa, peroxidasa y la citocromo oxidasa, influenciando el proceso de respiración; además afecta la proto-translocación en el complejo ATPasa (F_0F_1) catalizando la terminal de la fosforilación oxidativa en el cloroplasto; y con ello una reducción de la síntesis de ATP, alterando los procesos de duplicación, transcripción y traducción del ADN.

Hamouda *et al.* (2014), afirman que la azida de sodio afecta la síntesis de clorofila a y b en *Pisum sativum* y *Vicia faba*, trabajando con la dosis de 1mM, 2mM y 4mM, explicando que existe un disminución proporcional de estos compuestos a medida que se incrementa la dosis y el tiempo de remojo en el agente mutagénico; por otro lado ellos observan que en ambas especies existe un incremento significativo del contenido de carotenoides que es directamente proporcional a la dosis y al tiempo de remojo. Sin embargo Umar *et al.* (2011),

Señalan que en *Sorghum bicolor*, existe una reducción en el contenido de clorofila "a" con el incremento de la dosis (0.5% y 1.0%); sin embargo tanto la clorofila "b", como la clorofila total, se incrementaron de forma directamente proporcional a las dosis de NaN₃; además afirma que el contenido de proteínas en hojas, tallos y raíces se incrementó en 33.8%, 13.1% y 179.8% respectivamente.

2.3.4.3 EFECTOS CITOLÓGICOS

El índice mitótico, es un criterio para evaluar la citotoxicidad de diversos agentes químicos (Valencia, 2013), y los niveles de citotoxicidad de un compuesto están determinados por el incremento y decremento del índice mitótico (Fernández *et al.*, 2007), considerado hasta la actualidad como un parámetro que puede medir la citotoxicidad en los sistemas biológicos (Smaka-kindle *et al.*, 1996). Campo y Colleto (1999), trabajando con cebolla a partir de meristemas radiculares, observaron aberraciones cromosómicas, tales como: micronúcleos en la fase mitótica e interfase, rupturas cromosómicas, puentes anafásicos, stickiness y cromosomas rezagados. Khan *et al.* (2009) señalan un efecto marcado de la azida de sodio sobre el índice mitótico en semillas de cebada, manifestando que este mutágeno puede alterar y/o reducir en un 50% a más de la división celular, además aclaran que la razón se debe a la baja producción de ATP. Hamouda *et al.* (2014) trabajando con *Pisum sativum* y *Vicia faba*, observaron que en ambas especies, el porcentaje del índice mitótico es mayor bajo todas las dosis sometidas (1mM, 2mM y 4mM) respecto al control, además explica que existe una correlación directa entre el tiempo de remojo y el índice mitótico dentro de las tres dosis de azida de sodio, a su vez reporta anormalidades durante el ciclo mitótico como: micronúcleos, puentes cromosomales con retraso, stickiness en la metafase y que estas aumentan con la dosis y el tiempo de remojo. Por último Maxim *et al.* (2009) reportan que en semillas de *Carum carvi* (caraway), el índice mitótico disminuye proporcionalmente a medida que se incrementa la dosis de NaN₃, pero además afirman que las aberraciones se presentan en la profase.

2.3.4.4 EFECTOS MORFO-FÍSICOS

Los efectos morfo-físicos, son consecuencia de las alteraciones que causa la azida de sodio al ADN, modificando su síntesis, transcripción y traducción a proteínas. Gruszka *et al.* (2012), indican que este agente mutagénico ataca al complejo ATPasa, inhibiendo la producción de ATPs, trayendo con siglo alteraciones en la germinación, supervivencia, altura

de planta, longitud de raíz, peso seco, peso fresco, entre otras variable de carácter físico. Así mismo Adamu y Aliyu (2007), muestran que en *Lycopersicum sculentum* el efecto de la azida de sodio disminuyo el porcentaje de germinación y supervivencia, longitud de raíz, el número de hojas por planta. Por otro lado Al-qurainy (2009), trabajando en *Eruca sativa*, señala que la azida de sodio se relacionan de forma inversamente proporcional con la germinación, longitud de coleóptilo y radícula; sin embargo, con la dosis de 3mM se obtuvo en las variables altura de planta, área foliar, peso fresco y seco de hoja, tallo y raíz incremento significativo del 13.92%, 11.88%, 53.04%, 46.37%, 113.38%, 94.15%, 70.49% y 84.21% respectivamente. Ilbas *et al.* (2005), trabajando en cebada, obtuvieron con la dosis de 0.5 mM de azida de sodio mayor longitud de raíz, hoja y coleóptilo respecto al control a los 14 días de la siembra con tres horas de remojo.

Además de alterar las variables morfo-físicas de forma cuantitativa, también puede alterar de forma cualitativa. Castillo *et al.* (2001), en cebada con la técnica de dobles haploides, obtuvieron con la dosis de 10^{-4} mM de NaN_3 en la variedad Igri plantas con mutaciones clorofílicas (dos chlorinas y una xantha); además Mostafa (2011), observó en *Helianthus annuus* bajo las dosis tratadas (100ppm, 200ppm, 300ppm, 400ppm y 500 ppm de NaN_3), diferencias en la forma de la hoja, anormalidades en flor y presencia de hojas variegadas.

2.3.4.5 EFECTOS EN LA PRODUCCIÓN Y CALIDAD DE LOS CULTIVOS

La azida de sodio, es una alternativa, para la generación de variabilidad en el mejoramiento genético de planta, por ello muchos investigadores la utilizan para sus estudios, reportando beneficios, obteniendo genotipos de alta performance que son candidatos para ser seleccionado directamente como variedad o en programas de cruza para obtener híbridos, etc. A nivel de los cultivos existen reportes científicos que atribuyen un efecto positivo de este agente mutagenico, entre ellos tenemos:

- Pearson *et al.* (1975) informan que en la cebada, la altura de planta disminuye conforme se incrementa la dosis, información que es corroborada por Adamu *et al.* (2004) señalando que la altura de planta es dependiente de la dosis de aplicación.
- Krishna *et al.* (1984), señalan que la dosis de 1 mM de azida de sodio produjo una reducción del 20% en la altura de planta en grass, siendo la dosis más adecuada para este cultivo dentro de un programa de mejoramiento genético.

- Papadopoulou *et al.* (1996), trabajando con avena y con la técnica asistida por marcadores AFLP, lograron encontrar y discriminar genotipos de avena con resistencia a enfermedades.
- Bhagwat y Duncan (1988), empleando la técnica de mutagénesis *in vitro*, sometieron los meristemos de banano a diversos agentes mutágeno químicos (azida de sodio, dietil sulfato y etil metanosulfonato), obteniendo tasas de regeneración promedio de 4.6%, 1.9% y 6.1% respectivamente. El material regenerado fue sometido a *Fusarium oxysporum f. sp. Cubense*, obteniendo material resistente a partir de material inducido con azida de sodio.
- Chhun *et al.* (2003) señalan que obtuvieron genotipos mutantes de arroz resistentes a herbicidas en base a auxinas (2,4 D). Además comprobaron que la resistencia era expresada por dos genes mutantes recesivos arm1 y arm2.
- Mensah *et al.* (2007), obtuvieron genotipos de *Sésame indicum* precoces respecto a los días a la floración con las dosis de 0.0165% y 0.033% (4 días en promedio de diferencia para ambos respectivamente).
- Mshembula *et al.* (2012), trabajando con 5 genotipos de caupi (Tvu-3615, Tvu-2521, Tvu-3541, Tvu-3485 y Tvu-3574), encontraron que la azida de sodio incrementa el número de flores/planta, vainas/planta y semillas/vaina dentro los 5 genotipos evaluados.
- Ikhajiagbe *et al.* (2013), trabajando en arroz, con la variedad FARO-57, señalan que los efectos de la azida son positivos en las siguientes variables: número de granos/planta, peso fresco total, peso seco de semillas/panículas y peso seco total. Por otro lado solo con las dosis de 0.016%, 0.032% y 0.064% se incrementó del peso de 100 semilla respecto al control en un 30%, 1.9% y 3.39% respectivamente.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 UBICACIÓN DEL ÁREA EXPERIMENTAL.

La presente trabajo 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° 56'37.41" (O) y 12°4'40.22"(S), a una altitud de 245 msnm. Este experimento se realizó entre los meses de febrero y marzo del 2015.

3.2 MATERIAL VEGETATIVO

El material vegetal estuvo constituido por semillas de espárrago; de los cultivares UC 157 F1, UC 115 y la línea 2H-38H. Estos tres genotipos se caracterizan por:

UC 157 F1

Es un híbrido clonal que fue lanzado en 1975 y que hasta la fecha se ha convertido en el cultivar de espárrago predominante en California y en otras partes del mundo. Este cultivar produce turiones verdes con escamas, yemas comprimidas y punta cónica. Los turiones de diámetro mediano son uniformes, con una sección transversal redonda y además presenta alto grado de tolerancia a Fusarium y una tolerancia moderada a la roya.

UC 115

Híbrido originado en la Universidad de California en el 2005. Alto rendimiento en fresco, con tolerancia a Fusarium y Phytophthora megasperma y además presenta menor susceptibilidad al ataque de Prodiplosis. Este cultivar es precoz, altamente productivo con mayor número de turiones exportables y se desarrolla mejor en climas cálidos.

Los turiones son verdes con baja coloración púrpura. El ápice permanece cerrado hasta alcanzar toda su longitud, derivándose en turiones de alta calidad con buen calibre, el cual se mantiene durante el período de cosecha.

Línea pura 2H-38H

Línea pura obtenida a partir de la selección de plantas rendidoras de una plantación de espárragos de 20 años de edad. Los genotipos hembras y machos obtenidos se micropropagaron y la semilla obtenida del cruce entre estas plantas (masculinas y femeninas rendidores) dio origen a esta línea.

3.3 MATERIALES Y EQUIPOS

- Lápiz.
- Papel.
- Balanza analítica.
- Potenciómetro.
- Agua destilada.
- Placas petri.
- Frascos de vidrio (matraces, probetas, vaso precipitados de un litro).
- Papel toalla.
- Pinzas.
- Sustrato (tierra de chacra con arena de río en proporción 1:3)
- Cámara fotográfica.
- Solución buffer de fosfato monobásico de potasio a pH 3,
- Azida de sodio.

3.4 METODOLOGÍA

3.4.1 Procedimientos para la ejecución del experimento

El experimento se realizó en tres etapas: la primera se trabajó en la selección e inducción del material vegetal, y las dos últimas (laboratorio y tinglado) en la instalación y preparación del material vegetal para su respectivo análisis dentro de las variables analizadas.

3.4.2 Selección e inducción del material vegetal.

En esta etapa se trabajó con semillas de espárrago (*Asparagus officinalis* L.) de los cultivares UC 157 F1 y UC 115 y la línea 2H-38H. Estas semillas fueron sumergidas en agua destilada por 24 horas para activarlas, luego fueron sumergidas en azida de sodio a diferentes concentraciones (1mM, 3mM, 5mM, 7mM, 9mM) y sus respectivos testigos (agua y buffer de fosfato monobásico de potasio a pH 3).

3.4.3 Preparación de buffer de fosfato monobásico de potasio a pH 3

Se preparó 600 ml de buffer fosfato monobásico de potasio a una concentración de 0.4 molar; después con ayuda del potenciómetro y el ácido orto-fosfórico, se calibró el pH de la solución hasta 3. Una vez preparado el buffer, esta solución se divide en 6 partes de 100 ml cada una.

3.4.4 Preparación de la solución de azida de sodio

Se calculó en peso la cantidad de azida para preparar un 1mM, 3mM, 5mM, 7mM, 9mM para 100 ml.

1mM: 6.5 mg de NaN_3 en 100 ml de buffer.

3mM: 19.5 mg de NaN_3 en 100 ml de buffer.

5mM: 32.5 mg de NaN_3 en 100 ml de buffer.

7mM: 45.5 mg de NaN_3 en 100 ml de buffer.

9mM: 58.5 mg de NaN_3 en 100 ml de buffer.

3.4.5 Inducción de las semillas

Para cada genotipo se utilizó en total 5600 semillas, estas se remojaron por una horas.

3.4.6 Instalación del experimento en el laboratorio.

En laboratorio se seleccionó e indujo las semillas de los tres genotipos de espárrago. Se prepararon placas petri (4 por tratamiento y 28 por genotipo) y papel toalla para ponerlas a germinar (100 semillas por placa); así mismo estas placas sembradas fueron regadas con agua destilada a diario dentro de una cámara presentando las siguientes características: fotoperiodo 8/16 y temperatura de 25°C.

3.4.7 Instalación del experimento en el tinglado.

En el tinglado se sembraron las semillas de los dos cultivares (UC 157 F1 y UC 115) y la línea (2H38H) en macetas (100 semillas por macetas) con arena de río y tierra de chacra en proporción 3:1 (4 por tratamiento y 28 por genotipo).

3.4.8 Variables

Las variables en estudio se evaluaron en el laboratorio y en el tinglado.

Laboratorio

En el laboratorio, se evaluó:

1. Germinación: se contaron las semillas que germinaron por placa (100 semillas).
2. Longitud de radícula: se midieron la radícula de 15 semillas germinadas por placa; y se tomó el promedio.
3. Peso del germinado: se pesaron 15 semillas en proceso de germinación por placa; y se tomó el promedio.
4. Se estimó la velocidad de elongación de la radícula y la ganancia de peso del germinado: se obtuvieron a través de análisis de regresión lineal de cada repetición por tratamiento; siendo Y: longitud de radícula y peso del germinado y X: días de evaluación; calculando la pendiente de la curva, representado a la velocidad y este dato se utilizó para el análisis estadístico.
5. La relación plúmula – radícula: se obtendrá con el cociente entre la longitud de la plúmula y de la radícula de cada repetición.
6. DL50, se realizó una curva de regresión entre la germinación (Y) y los tratamientos de azida de sodio (X) respectivos.

Tinglado

1. Supervivencia: se contaron las semillas que emergieron por placa (100 semillas).
2. Altura de planta: se midió la altura de 15 plantas por maceta; el valor promedio de estas serán utilizadas como repetición.
3. Velocidad de elongación de la plántula: se obtuvo a través de análisis de regresión lineal de cada repetición por tratamiento (Y) por días de evaluación (X), representando la pendiente de la curva a la velocidad y este dato fue utilizado para el análisis estadístico.

El efecto promedio: se realizó de acuerdo a lo postulado por la OIEA, calculando el efecto de los tratamientos respecto al testigo de las 9 variables bajo estudio (sin contar con la DL₅₀), tomando la dosis que ocasione cambios de por lo menos del 20 % respecto al control (Maluszynski *et al.*, 1995).

3.4.9 Diseño estadístico

El diseño estadístico que se empleó en ambos ambientes (laboratorio y tinglado) es un DBCA con arreglo factorial 3A X 7C; siendo A: los genotipos y C: las dosis y además B en el diseño aditivo lineal, representa las repeticiones.

$$Y_{ijk} = u + A_i + B_j + C_k + (AC)_{ik} + E_{ijk}$$

3.4.10 Población y muestra

La muestra está compuesta de 5600 semilla de los cultivares UC 157 F1, UC 115 y genotipo 2H-38H respectivamente de la especie *Asparagus officinalis* L. donadas por el Ing. Andrés Casas en el año 2015.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES

Antes de empezar con la discusión de los datos, cabe decir que aún no se han registrados investigaciones sobre la azida de sodio en espárrago, por lo tanto la discusión se realizaron con artículos sobre este agente mutagénico en otras especies.

4.1 GERMINACIÓN

Los resultados obtenidos en el análisis de esta variable, indican que existen diferencias significativas en la respuesta de los genotipos, dosis y la interacción (Cuadro 1).

Cuadro 1. Análisis de variancia de la germinación de las semillas de espárrago (Alfa al 0.05).

FV	GL	SC	CM	F-CAL	P-VALOR	SIGN
BLOQUE	3	519,1	173,0333	2,197	0,09	NS
GENOTIPO (G)	2	8824,7	4412,3500	56,019	0,0001	***
DOSIS (D)	6	18937,2	3156,2000	40,071	0,0001	***
V*D	12	29130,3	2427,5250	30,820	0,0001	***
ERROR	60	4725,9	78,7650			
TOTAL	83	62137,2				

CV: 11.97

La prueba de Tukey reveló que los genotipos (Figura 1) responden de forma diferente, siendo superior el genotipo 2H-38H con un porcentaje de germinación del 84.071%, seguido por los cultivares UC 115 y UC 157 F1 (78.214% y 60% respectivamente). Estos resultados demuestran que la variedad UC 157 F1 ha sido más afectada en relación a los otros dos genotipos. La misma respuesta a nivel de genotipos fue reportada por Adamu y Aliyu (2007), trabajando en Tomate, observaron que a los ocho semanas después de la siembra, la germinación en los genotipos evaluados (T106, T224 y T420), presentaron porcentajes de germinación distintas con valores de 71.29%, 45.95% y 38.15% respectivamente, siendo los genotipos T224 y T420 los más afectados.

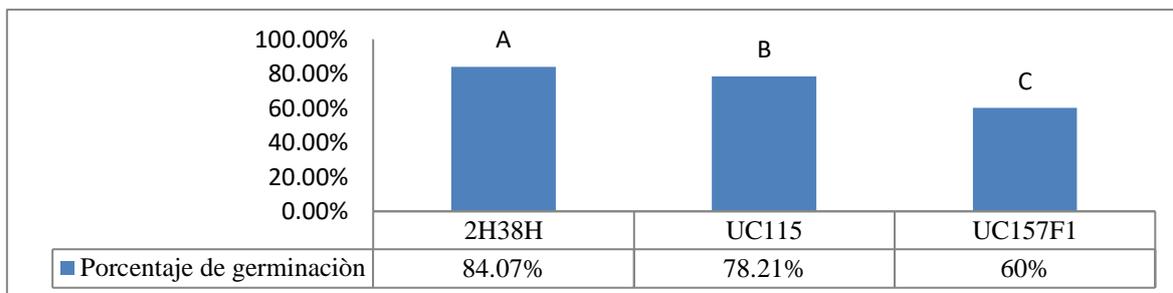


Figura 1. Respuesta de los cultivares de UC 157 F1 y UC 115 y de la línea de espárrago 2H-38H en el porcentaje de germinación. Prueba Tukey ($p \leq 0.05$).

Por otro lado, los tratamientos de azida de sodio marcaron una respuesta en el porcentaje de germinación (Figura 2). A partir de las dosis de 5mM, 7mM y 9mM se observó que la germinación respecto al testigo disminuyó en 33.08%, 37.25% y 31.25% respectivamente; además se puede apreciar que existe una relación inversa entre el porcentaje de germinación y la concentración de azida de sodio, este comportamiento también fue reportado por Adamu y Aliyu (2007) en tomate, Mesah *et al.* (2007) en Sesame, Bath *et al.* (2007) y Rao y Reddy (1986) en arroz, Mshembula *et al.* (2012) en caupi, Gnanamurthy *et al.* (2011) en maíz, Srivastava *et al.* (2011) en trigo, Elfeky *et al.* (2014) en girasol. En resumen la azida de sodio afectó a los tres genotipos a partir de la dosis de 5mM.

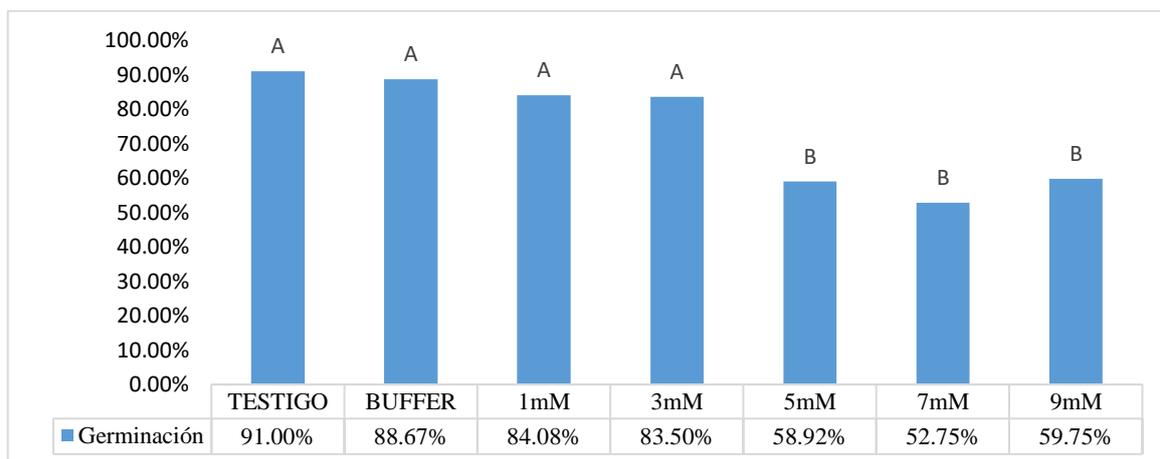


Figura 2. Efecto de las dosis de azida de sodio en el porcentaje de germinación. Prueba Tukey ($p \leq 0.05$).

La prueba Tukey de la interacción (Cuadro 2) así como se observa en la figura 3; en la línea 2H-38H, la dosis 5mM redujo el porcentaje de germinación respecto a los testigos en 41.5%, así mismo Joshi *et al.* (2011), en Cebolla, observaron en la variedad 6, las dosis de azida de 0.5% y 0.7% presentaron porcentaje de germinación por debajo del testigo. En el cultivar UC 157 F1 se observó que a partir de la dosis de 3mM, la germinación es afectada por la

azida de sodio; por otro lado en este genotipo se pudo observar que el porcentaje de germinación probablemente se pueda correlacionar de forma inversamente proporcional con el agente mutagénico, coincidiendo con Pande y Khetmalas (2012), en estevia, revelando que el porcentaje de germinación es dependiente de la dosis y además las dosis altas (0.1%, 0.2% y 0.25%) redujeron la germinación por debajo del 20%, además Mesah *et al.* (2007), en sesame, reportaron que la germinación es dependiente de la dosis y con las dosis más altas (0.125% y 0,250%) obtuvo reducciones significativas; cabe agregar que esta reducción en el porcentaje de germinación es explicado a través de los cambio en el funcionamiento normal de los proceso fisiológicos y biológicos necesarias en esta etapa (Al-Qurainy y Khan 2009).

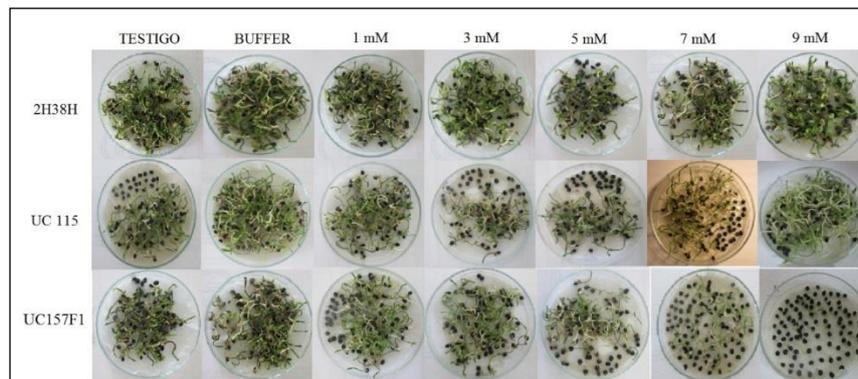


Figura 3. Efecto de la azida de sodio en la germinación de semillas de espárrago (UC 115, UC 157 F1 y 2H-38H).

Por otro lado en el cultivar UC 115 se observó que responde de forma diferente a las dosis expuestas, siendo el buffer fosfato el que afecto la germinación reduciéndola en 82%. Esta respuesta se debe a la naturaleza salina del buffer, ya que existe reportes en donde las sales producen un efecto marcado en la germinación (Mesa *et al.* 2007); sin embargo, la reducción de la germinación es debida al agente mutagénico solo con las dosis de 1mM a 7mM, siendo esta última la que redujo más la germinación en 26.5%; estos datos coinciden con los publicados por Adamu y Aliyu (2007), revelando que dos de sus tres genotipos (T106 y T224), las dosis de 1mM y 2mM redujeron de forma similar la germinación, mientras que la dosis de 4mM la redujo aún más, además Srivastava *et al.* (2011) revelaron que en el trigo, la dosis más alta (0.06%) redujo el porcentaje de germinación en 85.77% y para finalizar cabe decir que el cultivar UC 157 F1 mostró mayor susceptibilidad a las dosis, seguido por la UC 115; mientras que la línea 2H-38H, solo la dosis de 5mM redujo el porcentaje de germinación como agente mutagénico.

Cuadro 2. Prueba Tukey ($p \leq 0.05$) de los tratamientos sobre el porcentaje de germinación (%) en espárrago.

	2H-38H	UC157F1	UC115
TESTIGO	92.3 A	93.5 A	87.3 A
BUFFER	92.2 A	91.8 A	82 B
1mM	87.5 A	87 A	77.8 C
3mM	95.5 A	80.5 C	74.5 C
5mM	41.5 D	57.3 D	78 C
7mM	88.8 A	8.7 E	60.8 D
9mM	90.8 A	1.3 E	87.2 A

4.2 SUPERVIVENCIA

En relación a la supervivencia, se pudo observar respuestas diferentes dentro de los dos cultivares (UC 157 F1 y UC 115) y la línea 2H-38H, las dosis y sus respectivas combinaciones (Cuadro 3).

Cuadro 3. Análisis de variancia de la supervivencia de las semillas de espárrago (Alfa al 0.05).

FV	GL	SC	CM	F-CAL	P-VALOR	SIGN
BLOQUE	3	247,3	82,4333	0,713	0,548	NS
GENOTIPO (G)	2	4138,4	2069,2000	17,886	0,0001	***
DOSIS (D)	6	4095,5	682,5833	5,900	0,0001	***
G*D	12	4599,5	383,2917	3,313	0,001	**
ERROR	60	6941,2	115,6867			
TOTAL	83	20021,8				

CV: 14.67

El análisis Tukey (Figura 4) mostró que los dos cultivares y la línea respondían de forma diferente a la supervivencia. La línea 2H-38H presentó un porcentaje de supervivencia del 65.30%, mientras que los cultivares UC 115 (49.5%) y UC 157 F1 (47.86%) mostraron un comportamiento similar, así mismo esta respuesta también fue reportada por Adamu y Aliyu (2007) en tomate (T106, T224 y T420) señalando que existían diferencias significativas entre los genotipos utilizados. En base estos datos podemos decir que los cultivares UC 115 y UC 157 F1 son más afectados a la azida de sodio que la línea 2H-38H.

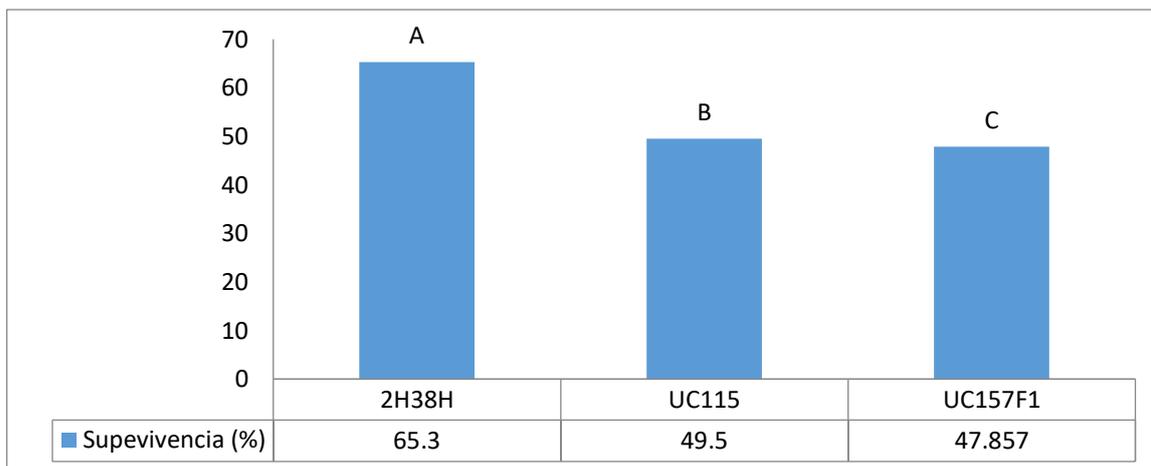


Figura 4. Respuesta de los cultivares de UC 157 F1 y UC 115 y de la línea de espárrago 2H-38H en el porcentaje de supervivencia. Prueba Tukey ($p \leq 0.05$).

El análisis Tukey sobre las dosis (Figura 5) reveló que los dos cultivares y la línea en promedio responden de forma diferente a las dosis de azida de sodio, dándose esta respuesta a partir de las dosis de 3mM, 5mM, 7mM y 9mM, causando la reducción de la supervivencia en 9.75%, 20.83% 15.58% y 12.75% respectivamente; sin embargo, la dosis de 1mM generó una respuesta similar a buffer, en otras palabras se comportó como una sal (Meza *et al.* 2007). En conjunto se observó que no existe una aparente relación entre la supervivencia y las dosis, como lo reportan Cletus y Muwa (2014), en *Phyllanthus odontadenius*, y Eze y Dambo (2015), en maíz. Sin embargo los cultivares UC 157 F1 y UC 115 y la línea 2H-38H en promedio son afectados por la azida de sodio a partir de la dosis de 3mM a más.

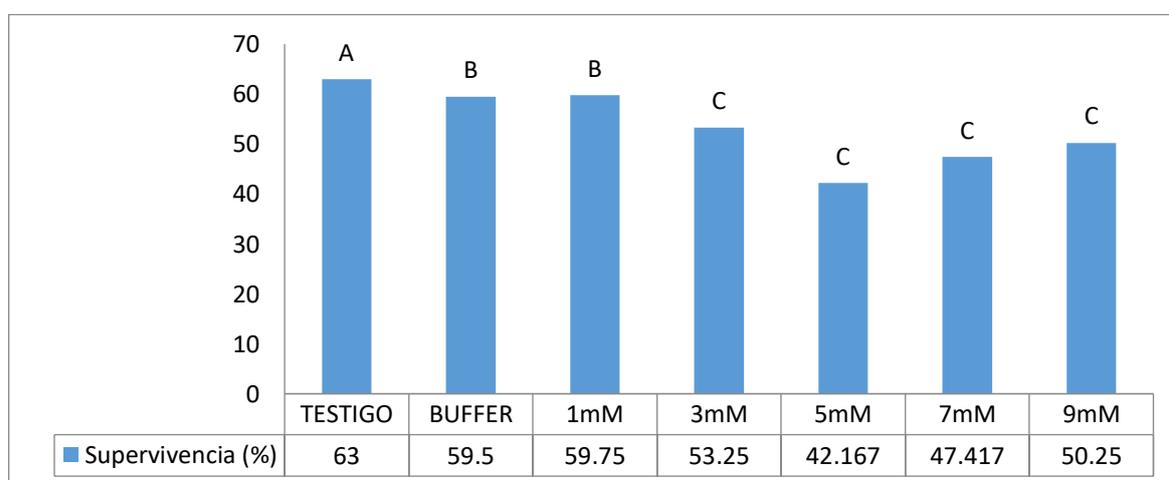


Figura 5. Efecto de las dosis de azida de sodio en el porcentaje de supervivencia. Prueba Tukey ($p \leq 0.05$).

Por otro lado la azida de sodio afectó de forma diferente dentro de los cultivares UC 157 F1, UC 115 y la línea 2H-38H (Cuadro 4 y figura 6). En relación a la línea 2H-38H se observó solo la dosis de 5mM redujo el porcentaje de supervivencia en 21.5% respecto al testigo, y

las otras manifestaron el mismo efecto del testigo y del buffer, así mismo este comportamiento es documentado por Eze y Dambo (2015), para una de las variedades de maíz estudiadas (SAMMAZ 18), donde las dosis 0,01mM y 0.04mM presentaron una supervivencia similar al testigo y Sander y Muehlbauer (1977), trabajando en *Pisum sativus*, revelaron que la supervivencia es afectada por el buffer fosfato a pH 3 obteniendo una reducción del 63%. En el cultivar UC 157 F1 se observó que a partir de la dosis de 3mM, el porcentaje de supervivencia se redujo en 13.8%, 27.3%, 30.8% y 34.8% respectivamente; además cabe recalcar que puede existir una relación inversamente proporcional entre la supervivencia de este cultivar con el agente mutagénico. Estos resultados coinciden con los reportados por Pande y Khetmalas (2012), quienes mencionan en stevia, las dosis de 0.05% a 0.25% inhiben de forma inversamente proporcional la supervivencia; además Mesah y Obadoni (2007) revelaron en maní que el porcentaje de supervivencia para la variedades estudiadas (SS1145B y RMP91) se reducía a medida que se incrementaba la dosis, siendo más sensible la cultivar RMP91.

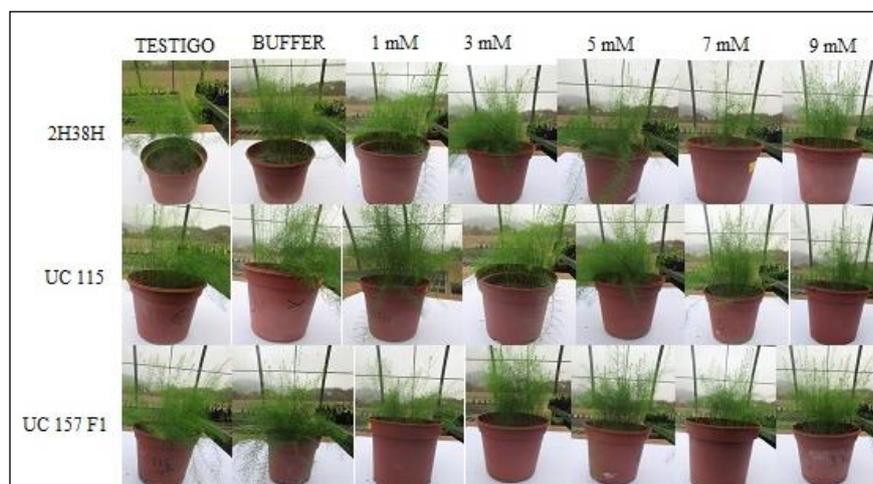


Figura 6. Efecto de la azida de sodio en la supervivencia en los cultivares de espárrago UC115, UC 157 F1 y la línea 2H-38H.

El cultivar UC 115 se apreció que la azida de sodio no causó efecto sobre la supervivencia y a partir de esta premisa cabe citar a Gichner *et al.* (1975), en cebada (variedad Dvoran), concluyeron que la azida de sodio no afectó la supervivencia y en arroz (variedad FARO-57), Ikhajiagbe *et al.* (2013), reportaron que la azida de sodio no causa efecto sobre la supervivencia, y al final de la evaluación todas las dosis utilizadas y el testigo presentaron en mismo efecto. Para finalizar la azida de sodio afecta el porcentaje de supervivencia en la línea 2H-38H (5mM) y el cultivar UC 157 F1 (3mM al 9mM) a través de los daños que puede ocasionar a nivel cromosomal y para ser más específicos durante la formación del

punteo mitótico ocasionando aberraciones fenotípicas (Mesah y Obadoni, 2007; Adegoke, 1984).

Cuadro 4. Prueba Tukey ($p \leq 0.05$) de los tratamientos sobre el porcentaje de supervivencia (%) en espárrago.

	2H-38H	UC157F1	UC115
TESTIGO	67,5 A	63,3 C	58,3 E
BUFFER	59 D	63 C	56,5 E
1mM	66 B	62,2 C	51,1 E
3mM	66,3 B	49,5 E	44 E
5mM	46 E	36 E	44,5 E
7mM	70,8 A	32,5 E	39 E
9mM	69 A	28,5 E	53,3 E

4.3 ALTURA DE PLANTA

El análisis de variancia sobre la altura de planta altura de planta reveló que los genotipos responden de forma diferente al agente mutagénico (Cuadro 5).

Cuadro 5. Análisis de variancia de la altura de planta en espárrago (Alfa al 0.05)

FV	GL	SC	CM	F-CAL	P-VALOR	SIGN
BLOQUE	3	3,04	1,01	0,96	0,42	NS
GENOTIPO (G)	2	128,88	64,44	61,04	0,00	***
DOSIS (D)	6	56,10	9,35	8,86	0,00	***
G*D	12	52,50	4,38	4,14	0,00	***
ERROR	60	63,34	1,06			
TOTAL	83	303,86				

CV: 21.569

La prueba Tukey para los genotipos (Figura 7) reveló que se comportan de forma diferente. La línea 2H-38H obtuvo una altura de planta de 16.21 cm; mientras que el cultivar UC 115 de 15.33 cm seguido por el cultivar UC 157 F1 de 13,26 cm. Estas diferencias también son documentadas por Adamu y Aliyu (2007), en tomate, donde solo el genotipo T106 presento plantas de mayor altura, sin embargo estos resultados son contradictorios a los obtenidos por Eze y Dambo (2015), revelando que la azida de sodio no causó efecto sobre la altura de planta en las dos variedades de maíz (SAMMAZ18 y SAMMAZ 20). Ante el estudio realizado se pudo observar que el cultivar UC 157 F1, es el más afectado por la azida de sodio.

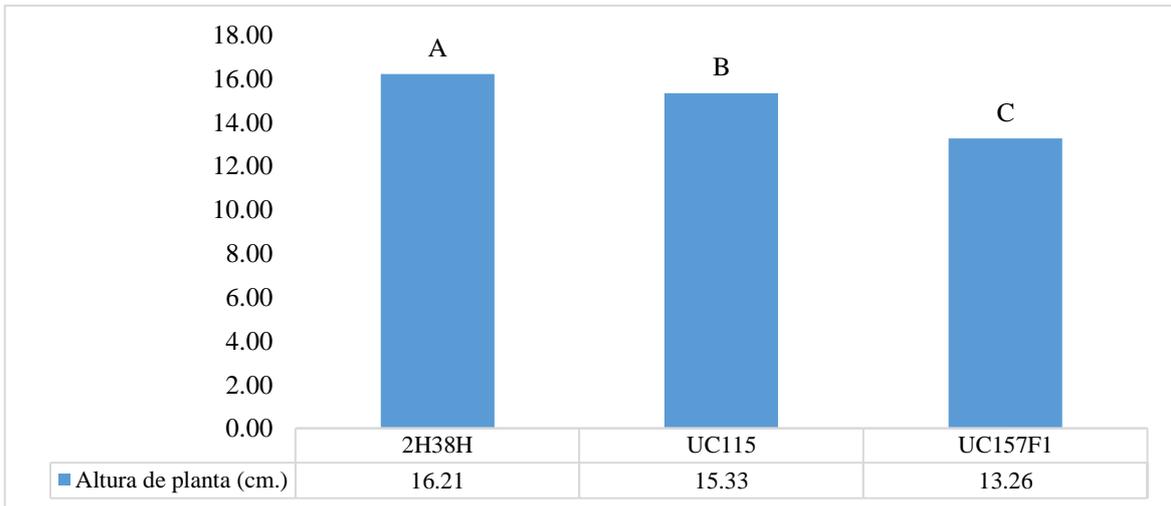


Figura 7. Respuesta de los cultivares de UC 157 F1 y UC 115 y de la línea de espárrago 2H-38H en la altura de planta. Prueba Tukey ($p \leq 0.05$).

El agente mutagénico en promedio de los genotipos se observó que la altura de planta difiere (Figura 8), además puede existir una dependencia entre la altura y la concentración de azida de sodio. Los dos cultivares y la línea 2H-38H son afectados por la azida de sodio a partir de la dosis de 3mM, teniendo una reducción máxima con la dosis de 9mM de 2.26 cm respecto al testigo; este evento también se produjo en las investigación que realizaron Adamu y Aliyu (2007) en tomate.

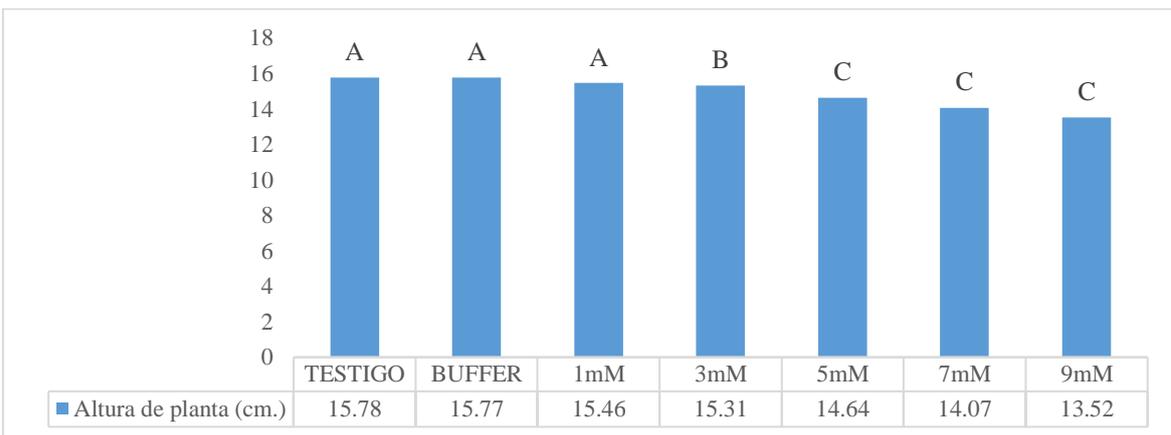


Figura 8. Efecto de las dosis de azida de sodio en la altura de planta. Prueba Tukey ($p \leq 0.05$)

En los tratamientos (Cuadro 6) se observó que los genotipos responden de forma diferente ante la azida de sodio. En el caso del cultivar UC 115 y línea 2H-38H, se observó que no existe dependencia entre la altura de planta y la azida de sodio, sin embargo en la línea 2H-38H, la dosis de 5mM redujo el altura de planta en 1.9cm respecto al testigo; en cambio el cultivar UC 115, las dosis 3mM a 7mM disminuyeron la altura afectando más la dosis de 7mM. El cultivar UC 157 F1 se tuvieron reducciones con las dosis de 5mM a 9mM (1.2 cm,

2.8 cm, 2.5 cm respectivamente), mientras que las demás produjeron una respuesta similar al buffer. Este comportamiento se apreció en la investigación realizada por Mesah *et al.* (2007), indicando que la variedad de maní SS1145B, las dosis de 0.02% y 0.05% redujeron la altura de planta, mientras que las demás dosis presentaron el mismo efecto que el testigo; por otro lado la variedad de maní RMP91, solo las dosis de 0.03% y 0.05% redujeron la altura; además El-Mokadem y Mostafa (2014), reportaron en *Browallia speciosa* que la dosis de 800 ppm y el testigo revelaron el mismo efecto, mientras que las otras dosis afectaron de forma similar y con la dosis de 400 ppm la altura de planta fue superior al testigo, también Ikhajiagbe *et al.* (2013), trabajando en arroz, concluyeron que la altura de planta es reducida con la dosis de 0.008%; así mismo Kochanová *et al.* (2012), trabajando en *Diospyros lotus*, documentaron que las azida de sodio afectó de forma negativa la altura de planta, por otro lado Cletus y Muwa (2014), observaron en *Phyllanthus odontadenius*, que las dosis de azida de sodio no ejercían efecto sobre la altura de planta. Todos estos resultados son explicados por Salim *et al.* (2009) señalaron que el efecto de la azida de sodio suele depender en gran medida del genotipo y con el tiempo estos pueden recuperar su estado normal, igualmente el efecto de este agente mutagénico preparado con buffer a pH 3 puede afianzar su naturaleza mutagénica y motivar cambios en la altura. El comentario anterior es respaldado por Sander *et al.*, 1972; Conger, 1973; Konzak *et al.*, 1975 señalando que la azida de sodio reduce la altura planta a pH 3. Ante este análisis se puede concluir que la dosis de 5mM afectó de forma similar la altura de planta en los dos cultivares y línea pura evaluada.

Cuadro 6. Efecto de los tratamientos sobre la altura de planta (cm.) en espárrago. Prueba Tukey ($p \leq 0.05$).

	2H-38H	UC157F1	UC115
TESTIGO	16,80 A	13,80 E	16,70 C
BUFFER	15,70 C	14,60 D	16,00 C
1mM	16,20 B	15,20 D	15,90 C
3mM	16,90 A	14,40 D	14,70 D
5mM	14,90 D	12,60 F	14,70 D
7mM	16,10 C	11,00 F	13,50 F
9mM	16,80 A	11,30 F	15,90 C

4.4 PESO DEL GERMINADO

En relación al peso del germinado, el ANVA general revela respuestas diferentes entre los genotipos, concentraciones de azida de sodio y la interacción (Cuadro 7).

Cuadro 7. Análisis de variancia del peso del germinado en espárrago (Alfa al 0.05).

FV	GL	SC	CM	F-CAL	P-VALOR	SIGN
BLOQUE	3	0,00	0,00	0,60	0,62	NS
GENOTIPO (G)	2	0,01	0,00	21,31	0,00001	***
DOSIS (D)	6	0,02	0,00	21,10	0,00001	***
G*D	12	0,02	0,00	10,64	0,00001	***
ERROR	60	0,01	0,00			
TOTAL	83	0,04				

CV: 16.584

El análisis Tukey realizado a nivel de genotipos (Figura 9) reveló que estos responden de forma diferente ante azida de sodio. El cultivar UC 115 (0.06 gr.) y UC 157 F1 (0.06 gr.) presentaron menor peso del germinado, denotándolas como las más afectadas por el agente mutagénico y este comportamiento es contrario a lo obtenido por Mshembula *et al.* (2012), trabajando en Caupi, observaron que los cinco genotipos no presentaban diferencia alguna en relación al peso del germinado.

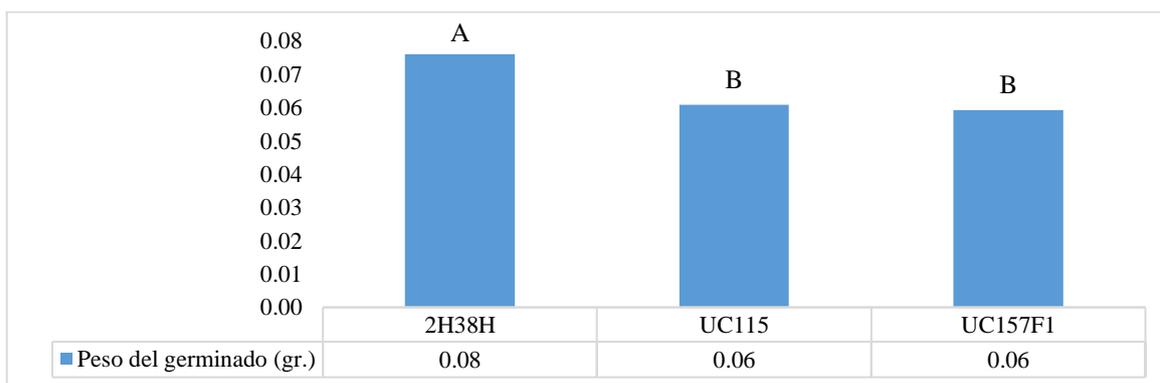


Figura 9. Respuesta de los cultivares de UC 157 F1 y UC 115 y de la línea de espárrago 2H-38H en el peso del germinado. Prueba Tukey ($p \leq 0.05$).

En caso de las dosis (Figura 10), se apreció que los cultivares UC 157 F1 y UC 115 y la línea 2H-38H son afectados por el agente mutagénico a partir de la dosis de 1mM, asimismo se observó que existe una dependencia entre el peso del germinado con el agente mutagénico. Esta respuesta pudo ser ocasionada por la alteración de la membrana mitocondrial a nivel de la bomba de protones, reduciendo de la producción normal de ATP disminuyendo el peso del germinado (Zhang, 2000).

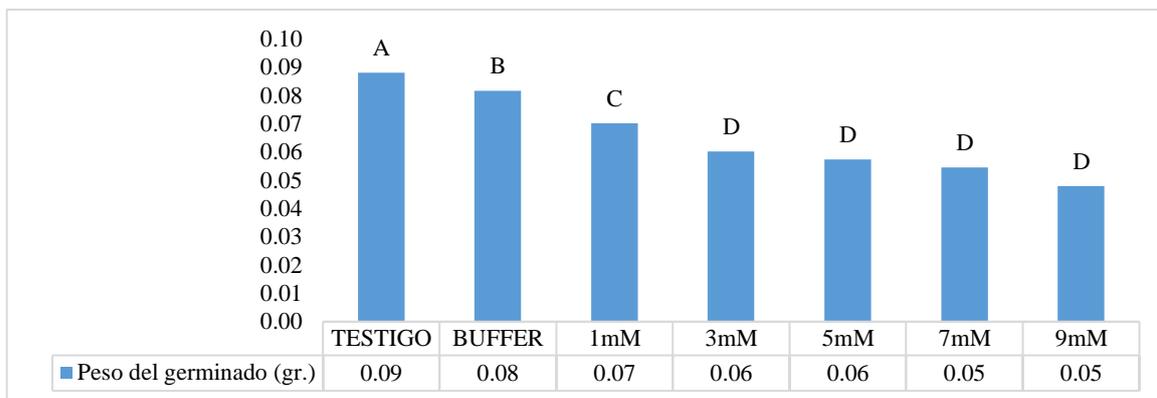


Figura 10. Efecto de las dosis de azida de sodio en el peso del germinado. Prueba Tukey ($p \leq 0.05$).

Los tratamientos (Cuadro 8) revelaron que los tres genotipos responden de forma diferente a la azida de sodio. La línea pura 2H-38H y el cultivar UC 115 presentaron una respuesta que no es dependiente al agente mutagénico y solo en la línea 2H-38H en las dosis de 1mM, 3mM, 5mM y 9mM disminuyó el peso de forma similar, pero la dosis de 5mM ocasionó una reducción del peso mayor a las otras en 0.0365 gr. El cultivar UC 115, las dosis de 3mM y de 7mM mantuvieron el mismo comportamiento reduciendo el peso en 0.0192 gr. y 0.0262 gr., en promedio respectivamente; por otro lado el cultivar UC 157 F1, el peso del germinado se reducía a medida que se incrementaba la dosis, evidenciado una posible dependencia siendo las dosis más altas (7mM y 9mM) las que afectaron más a este cultivar (0.0668 gr. y 0.0903 gr., respectivamente). El comportamiento de los tres genotipos es explicado por Salim *et al.* (2009), señalando que el efecto de la azida de sodio depende mucho del genotipo.

Cuadro 8. Prueba Tukey ($p \leq 0.05$) de los tratamientos sobre el peso del germinado (gr.) en espárrago.

	2H-38H	UC157F1	UC115
TESTIGO	0,0953 A	0.0939 A	0.0747 D
BUFFER	0.0868 C	0.0916 B	0.0665 D
1mM	0.0757 D	0.0751 D	0.0595 D
3mM	0.0607 D	0.0643 D	0.0555 E
5mM	0.0588 D	0.0563 E	0.0567 D
7mM	0.0881 C	0.0271 F	0.0485 E
9mM	0.0727 D	0,0036 F	0.0641 D

4.5 LONGITUD DE RADÍCULA

El ANVA general (Cuadro 9) reveló que existen respuestas diferentes entre los genotipos ante la azida de sodio en relación a la longitud de raíz.

Cuadro 9. Análisis de variancia de la longitud de raíz en espárrago Alfa al 0.05)

FV	GL	SC	CM	F-CAL	P-VALOR	SIGN
BLOQUE	3	0,84	0,28	1,08	0,36	NS
GENOTIPO (G)	2	15,92	7,96	30,99	0,00	***
DOSIS (D)	6	11,88	1,98	7,71	0,00	***
G*D	12	15,01	1,25	4,87	0,00	***
ERROR	60	15,41	0,26			
TOTAL	83	59,06				

CV: 17.896

La respuesta en la longitud de raíces de los genotipos (Figura 11) ante la azida de sodio es diferente teniendo al cultivar UC 157 F1 (0.76 cm.) como el más afectado ante la exposición al agente; mientras que el cultivar UC 115 (1.82 cm.) y la línea 2H-38H son menos sensibles. Este comportamiento es similar a lo citado por Adamu y Aliyu (2007), indicando que el genotipo de tomate "T106" manifestó una longitud de raíz menos afectada en relación a los demás genotipos (T224 y T420).

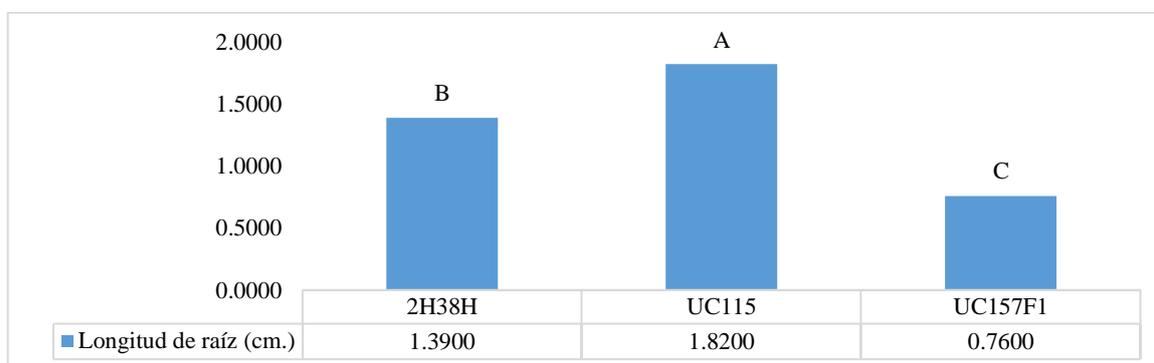


Figura 11. Respuesta de los cultivares de UC 157 F1 y UC 115 y de la línea de espárrago 2H-38H en la longitud de raíz. Prueba Tukey ($p \leq 0.05$).

El análisis de las dosis (Figura 12) revelaron que no existe respuestas por parte del agente mutagénico, sin embargo estas reducciones en la longitud de raíz son debidas al buffer fosfato, así mismo dentro de este grupo solo la dosis de 7mM redujo la longitud con un valor de 0.87 cm. A pesar de ello solo se puede rescatar que esta reducción es por la naturaleza salina del compuesto (Meza *et al.* 2007). Este comportamiento también se obtuvieron en caupi (Mshembula *et al.* 2012) donde se observaron que las dosis de azida de sodio junto con el testigo mantenían el mismo efecto sobre los cinco genotipos de caupi (TVU-3615, TVU-2521, TVU-3541, TVU-3485, TVU-3574); por lo tanto la azida de sodio no afecto a los tres genotipos de espárragos en promedio, pero si el buffer bajos condiciones de pH 3.

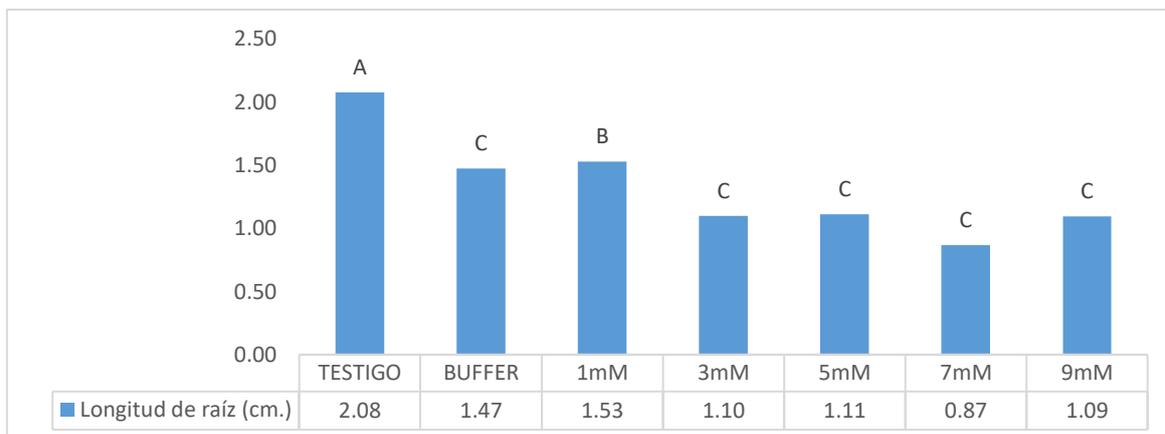


Figura 12. Efecto de las dosis de azida de sodio en la longitud de raíz. Prueba Tukey ($p \leq 0.05$).

En relación a los tratamientos, los genotipos reaccionaron de forma distinta a la azida de sodio (Cuadro 10), así como se observa en la figura 13. La línea pura 2H-38H responde de forma variable a la azida de sodio, pero cabe rescatar que la dosis de 1mM provocó el incremento de la longitud de raíz en 0.5 cm respecto al testigo; mientras que las dosis de 3mM, 5mM y 9mM causaron una reducción similar pero inferiores al testigo en 0.1cm, 0.3cm y 0.2cm respectivamente; en cambio el cultivar UC 115, las dosis de 1mM (1.5 cm.) hasta 7mM (1.0 cm.) redujeron la longitud de raíz; en cambio, el cultivar UC 157 F1 no manifiesta respuesta diferente al testigo. Los resultados obtenidos en la línea 2H-38H y UC 115 son similares a lo obtenido por Adamu y Aliyu (2007), resaltando que el genotipo de tomate T106, las dosis de 1mM y 2mM incrementaron la longitud de raíz, mientras que la dosis de 4mM presentó un efecto similar al testigo y además Mshembula *et al.* (2012), mencionan que dentro del cultivo de caupi, el genotipo TVU- 3541, el testigo junto con la dosis de 0.125% compartían el mismo efecto.

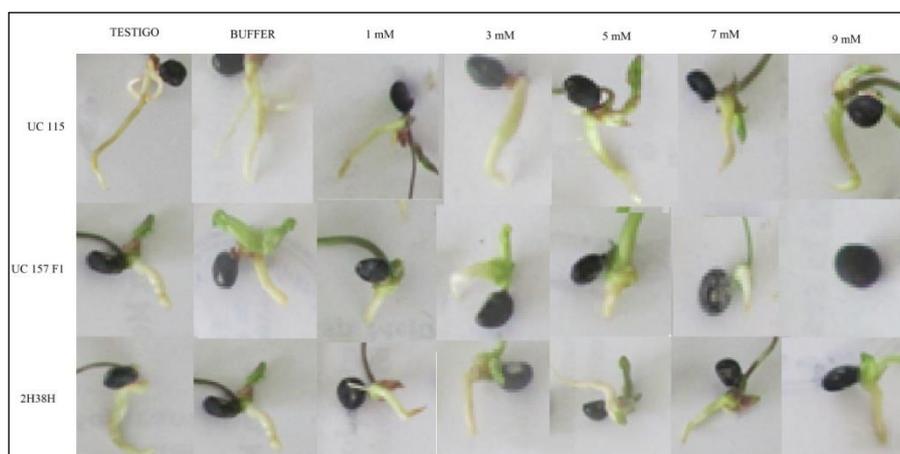


Figura 13. Efecto de la azida de sodio en la longitud de radícula en los cultivares UC 115 y UC 157 F1 y la línea pura 2H-38H).

En relación al cultivar UC 157 F1, este comportamiento es contradictorio a lo obtenido por Srivastava *et al.* (2011), indicando que la azida de sodio ocasionó la reducción de esta variable a medida que se incrementa la dosis, sin embargo este genotipo se recuperó mostrando el mismo efecto que el testigos (Salim *et al.*, 2009). En referencia a lo citado anteriormente podemos decir que el cultivar UC 157 F1 es más tolerante a la exposición a la azida de sodio; mientras que la línea 2H-38H la dosis de 1mM incremento la longitud de raíz.

Cuadro 10. Prueba Tukey ($p \leq 0.05$) de los tratamientos sobre la longitud de raíz (cm.) en espárrago.

	2H-38H	UC157F1	UC115
TESTIGO	1,40 C	1,10 D	3,80 A
BUFFER	1,40 C	1,20 D	1,80 B
1mM	1,90 B	1,20 D	1,50 C
3mM	1,28 D	0,70 D	1,25 D
5mM	1,10 D	0,90 D	1,26 D
7mM	1,30 C	0,20 D	1,00 D
9mM	1,20 D	0,00 D	2,00 B

4.6 ESTIMACIÓN DE LA VELOCIDAD DE LA ELONGACIÓN DE LA RADÍCULA

La velocidad de elongación de la radícula, el análisis ANVA reveló que los genotipos responden diferente ante la azida de sodio (Cuadro 11).

Cuadro 11. Análisis de variancia de la velocidad de elongación de la radícula en espárrago (Alfa al 0.05).

FV	GL	SC	CM	F-CAL	P-VALOR	SIGN
BLOQUE	3	0,0013	0,0004	0,9726	0,9800	NS
GENOTIPO (G)	2	0,0585	0,0292	64,1572	0,0001	****
DOSIS (D)	6	0,0604	0,0101	22,0878	0,0001	****
G*D	12	0,0567	0,0047	10,3620	0,0001	****
ERROR	60	0,0274	0,0005			
TOTAL	83	0,2043				

CV: 21.369

Los genotipos (Figura 14) mostraron respuestas diferentes en relación a la velocidad de elongación de la radícula. El cultivar UC115 (0.1051 cm/día) obtuvo una velocidad mayor a línea 2H-38H (0.0820 cm/día) y al cultivar UC 157 F1 (0.0415 cm/día). Este comportamiento coincide con los resultados de Adamu y Aliyu (2007), sobre la longitud de radícula, en la cual confirma que el genotipo T106 manifestó una mayor longitud que las otras dos variedades de tomate (T224 yT420), y por ello se puede decir que la estimación de

la velocidad en la elongación de la radícula ha sido mayor en este genotipo. Por otro lado estos resultados son contradictorios a lo obtenidos por El-Kaaby *et al.* (2015), observando que la altura de radícula a las tres semanas para ambos cultivares de tomate (Super Regina y Trescantos) fue el mismo y por lo tanto se puede asumir que la estimación de la rapidez en esta variable es semejante para ambas variedades.

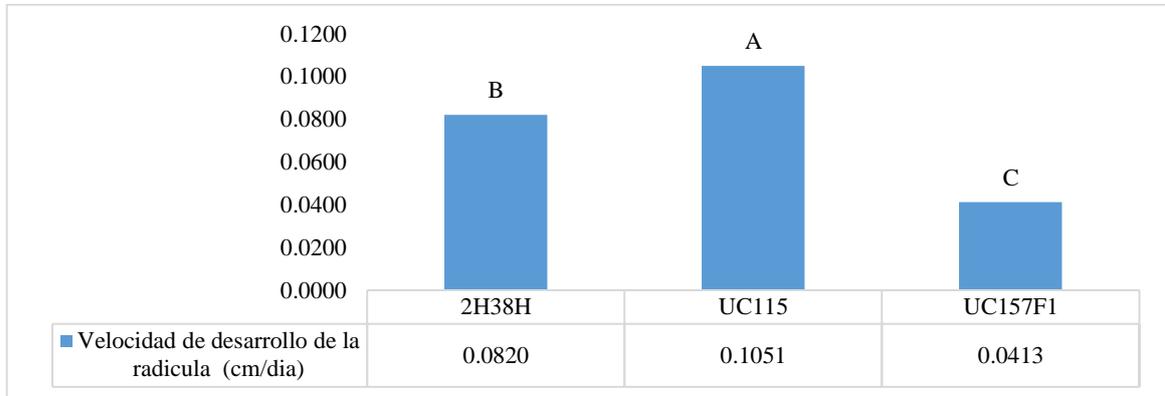


Figura 14. Respuesta de los cultivares de UC 157 F1 y UC 115 y de la línea de espárrago 2H-38H en la velocidad de elongación de la radícula. Prueba Tukey ($p \leq 0.05$).

Las dosis de azida de sodio (Figura 15) marcaron diferencia en la rapidez dentro de los tres genotipos; además se puede presumir que la velocidad de elongación de la radícula es dependiente al agente mutagénico. Este comportamiento es similar a lo obtenido por El-Kaaby *et al.* (2015), en tomate a las tres semanas, obteniendo con la dosis de 4mM una longitud menor, lo cual puede intuir que la estimación de la velocidad también lo fue. Bajo el argumento anterior podemos decir que las dosis en estudio afectan la velocidad de la elongación de la radícula a excepción de la dosis de 1mM, siendo la dosis de 7mM, la que ocasiona un mayor efecto reduciendo la velocidad en 0.0847 cm/día.

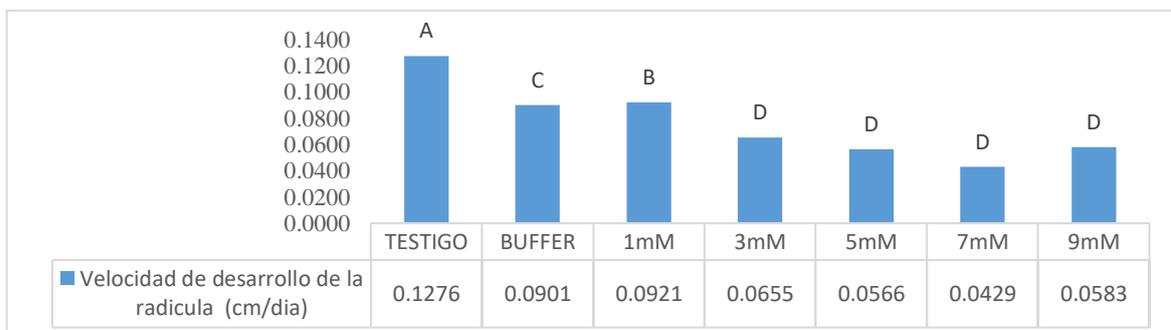


Figura 15. Efecto de las dosis de azida de sodio en la velocidad de elongación de la radícula. Prueba Tukey ($p \leq 0.05$)

En relación a los tratamientos (Cuadro 16), se apreció que la respuesta es diferente dentro de cada genotipo. En el caso de la línea pura 2H-38H se observó que las dosis de 1mM (0.1129 cm/día) y 5mM (0.0611 cm/día) incentivaron respuestas opuestas al testigo, ya que

la primera incremento la velocidad en 0.0276 cm/día, mientras que la otra la redujo en 0.0242 cm/día. El cultivar UC 157 F1, el buffer (0.0671 cm/día) y la dosis de 1mM (0.0701 cm/día) ocasionaron un aumento en la velocidad de elongación de la radícula, mientras que las demás dosis ocasionaron su reducción, afectando más la dosis de 9mM reduciendo la velocidad en 0.0601 cm/día; por otro lado el cultivar UC 115, la dosis de 7mM redujo de la velocidad en 0.186 cm/día. Esto resultados evidencian que la respuesta es dependiente del genotipo (Salim *et al.* 2009).

Cuadro 12. Prueba Tukey ($p \leq 0.05$) de los tratamientos sobre la velocidad de elongación de la radícula (cm/día) en espárrago.

	2H-38H	UC157F1	UC115
TESTIGO	0.0853 D	0.061 E	0.2366 A
BUFFER	0.0922 D	0.0671 D	0.1113 B
1mM	0.1129 B	0.0701 D	0.0936 D
3mM	0.0830 D	0.0406 F	0.0725 D
5mM	0.0611 E	0.041 F	0.0680 D
7mM	0.0693 D	0.0085 F	0.0506 F
9mM	0.0708 D	0.0009 F	0.1031 B

4.7 ESTIMACIÓN DE LA GANANCIA DEL PESO DEL GERMINADO

El análisis de variancia reveló que la estimación de la ganancia de peso diario del germinado es diferente en los genotipos, en las dosis la azida de sodio así como en la interacción (Cuadro 13).

Cuadro 13. Análisis de variancia de la estimación de la ganancia de peso diario del germinado en espárrago (Alfa 0.05).

FV	GL	SC	CM	F-CAL	P-VALOR	SIGN
BLOQUE	3	0,0000	0,0000	1,7297	0,1610	NS
GENOTIPO (G)	2	0,0000	0,0000	30,4865	0,0001	****
DOSIS (D)	6	0,0000	0,0000	16,0000	0,0001	****
G*D	12	0,0000	0,0000	12,2703	0,0001	****
ERROR	60	0,0000	0,0000			
TOTAL	83	0,0001				

CV: 14.568

En relación a los genotipos (Figura 16), se puede apreciar que la línea 2H-38H mantuvo una ganancia de peso 0.0042 gr/día, mientras que los cultivares mantuvieron una ganancia por debajo, pero similar. Estos resultados manifiestan que la diferencia se atribuye a la capacidad en recuperarse de cada genotipo (Salim *et al.*, 2009), en otras palabras se puede observar que la línea 2H-38H es más tolerante al efecto de la azida que los otros dos.

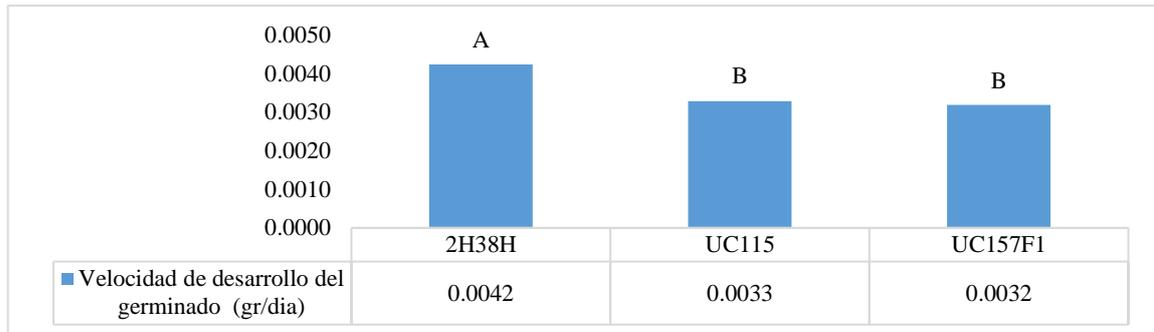


Figura 16. Respuesta de los cultivares de UC 157 F1 y UC 115 y de la línea de espárrago 2H-38H en la estimación de la ganancia de peso diario del germinado. Prueba Tukey ($p \leq 0.05$).

En relación a las dosis (Figura 17) se pudo apreciar que solo a partir de la dosis de 5mM, 7mM y 9mM la ganancia de peso es debida al agente mutagénico, generando valores promedios de 0.0010 gr/día, 0.0013 gr/día y 0.0017 gr/día por debajo del testigo respectivamente. Este comportamiento se da por las alteración que ocasiona este agente mutagénico en la producción de ATPs (Zhang, 2000) alterando los procesos implicados en la germinación (Al-Qurainy y Khan 2009) y con ello la velocidad.

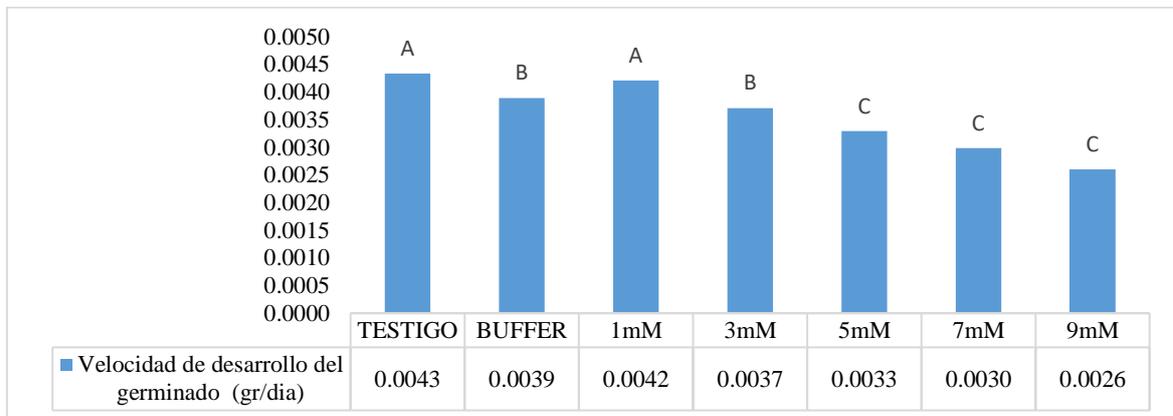


Figura 17. Efecto de las dosis de azida de sodio en la estimación de la ganancia de peso diario del germinado. Prueba Tukey ($p \leq 0.05$).

En relación a los tratamientos (Cuadro 14) el germinado de cada genotipo gana peso diario de forma distinta ante el agente mutagénico. La línea 2H-38H, la dosis de 7mM incentivó el aumento de la masa diaria por encima del testigo en 0.0003 gr/día, mientras que las dosis de 3mM y 5mM redujeron la ganancia de peso en 0.0008 gr/día y 0.0009 gr/día respecto al testigo; por otro lado en el cultivar UC 157 F1, la dosis de 1mM disminuyó el valor del peso diario en 0.0002 gr/día respecto al testigo; sin embargo las dosis de 5mM, 7mM y 9mM redujeron la acumulación de masa diaria en 0.0012 gr/día, 0.0028 gr/día y 0.0041 gr/día respectivamente y para culminar el cultivar UC 115, las dosis de 5mM y 7mM estimularon el descenso de la ganancia de peso diario en 0.0011 gr/día y 0.0016 gr/día . Todas estas

respuestas pueden atribuirse a la estimulación de la tasa de crecimiento celular positiva o no, así como la activación de las hormonas de crecimiento (Joshi *et al.*, 2011).

Cuadro 14. Prueba Tukey ($p \leq 0.05$) de los tratamientos sobre la velocidad del peso del germinado (gr/día) en espárrago.

	2H-38H	UC157F1	UC115
TESTIGO	0.0045 B	0.0044 C	0.0041 C
BUFFER	0.0042 C	0.004 C	0.0033 D
1mM	0.0044 C	0.0046 B	0.0035 D
3mM	0.0037 D	0.0041 C	0.0032 D
5mM	0,0036 D	0.0032 D	0.003 E
7mM	0.0048 A	0.0016 F	0.0025 E
9mM	0.0041 C	0.0003 F	0.0033 D

4.8 ESTIMACIÓN DE LA VELOCIDAD DE LA ELONGACIÓN DE LA PLÁNTULA

La estimación de la velocidad de elongación de la plántula (Cuadro 15) difiere a nivel de genotipo, dosis de azida de sodio así como la interacción entre ellos.

Cuadro 15. Análisis de variancia de la velocidad de la elongación de la plántula (cm/día) bajo condiciones controladas en espárrago (Alfa al 0.05).

FV	GL	SC	CM	F-CAL	P-VALOR	SIGN
BLOQUE	3	0,0058	0,0019	0,8351	0,4800	NS
GENOTIPO (G)	2	0,0586	0,0293	12,6722	0,0001	****
DOSIS (D)	6	0,1925	0,0321	13,8674	0,0001	****
G*D	12	0,1304	0,0109	4,6955	0,0001	****
ERROR	60	0,1388	0,0023			
TOTAL	83	0,5258				

CV: 20.56

El análisis Tukey realizado a los genotipos (Figura 18) reveló que la UC 157 F1 (1.5941 cm/día) es el más afectado en la velocidad por el agente mutagénico, mientras que la línea 2H-38H junto con el cultivar UC 115 mantuvieron la velocidad de elongación en 2.2235 cm/día y 2.0950 cm/día respectivamente. Este comportamiento indica que la repuesta genotípica es distinta, como señalan Salim *et al.* (2009) y para finalizar el cultivar UC 157 F1 fue el más afectado por tener una velocidad de elongación menor a los otros genotipos; además García *et al.* (2010) confirma que mientras más afectado este crecimiento y desarrollo de la semilla por el agente mutagénico mayor es la probabilidad de obtener mutantes.

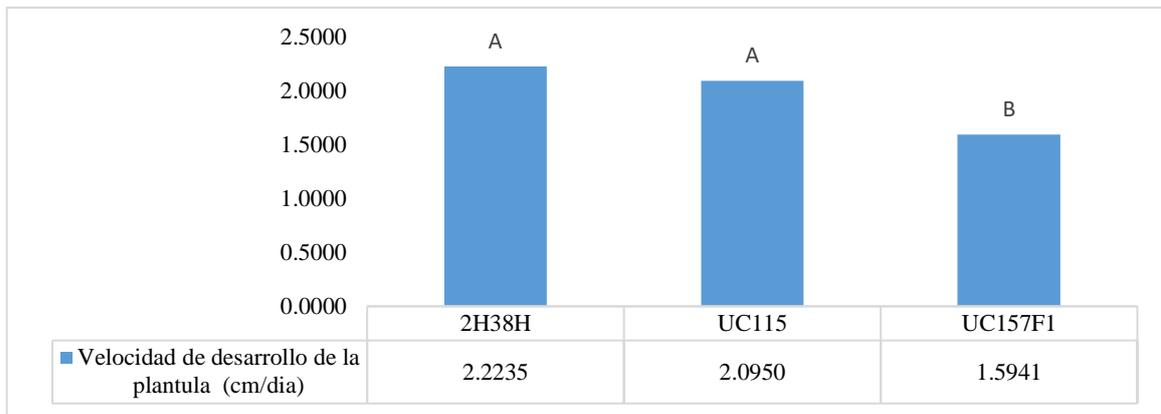


Figura 18. Respuesta de los cultivares de UC 157 F1 y UC 115 y de la línea de espárrago 2H-38H en la estimación de la velocidad de elongación de la plántula. Prueba Tukey ($p \leq 0.05$).

La prueba Tukey de las dosis (Figura 19) reveló que a partir de la dosis de 3mM hasta la de 9mM son debidas a la azida de sodio y solo la dosis de 7mM afecto más a los genotipos disminuyendo la velocidad en 0.1283 cm/día. Estos resultados obtenidos pudieron deberse al efecto que provocó la azida de sodio durante el proceso de respiración celular, reduciendo la producción ATPs (Van y Inouye, 1991), así como disminuir la expresión normal de las hormonas de crecimiento implicadas en la elongación de la plántula (Joshi *et al.*, 2011).

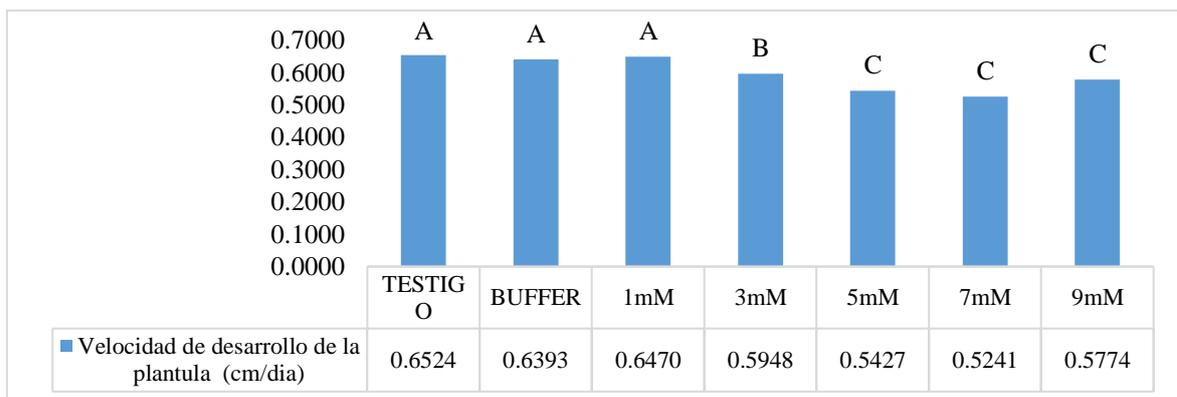


Figura 19. Efecto de las dosis de azida de sodio en la estimación de la velocidad de la elongación de la plántula. Prueba Tukey ($p \leq 0.05$).

En los tratamientos (Cuadro 16) se puede apreciar que la línea 2H-38H y el cultivar UC 115, las respuestas ante las dosis de azida de sodio son variables, es por ello que la velocidad de elongación de la plántula no es dependiente de la dosis. La línea 2H-38H las dosis de 3mM, 5mM y 7mM redujeron la velocidad de forma similar, pero mayor a las otras dosis en 0.1062 cm/día, 0.1240 cm/día y 0.1942 cm/día respectivamente; por otro lado el cultivar UC 157 F1, la dosis de 1mM incremento la velocidad en 0.0873 cm/día, mientras que las dosis de 5mM, 7mM y 9mM la redujeron; sin embargo en el cultivar UC 115 se observó que la dosis de 7mM disminuyo la velocidad de elongación en 0.1286 cm/día. Este comportamiento se

puede atribuir a la reducción de la producción de ATPs (Van y Inouye, 1991); sin embargo el cultivar UC157F1, la dosis de 1mM, incremento la velocidad de elongación y esto puede conferirse a una estimulación positiva del ciclo celular y del balance hormonal, más que todo en la producción de auxinas (Joshi *et al.*, 2011).

Cuadro 16. Prueba Tukey ($p \leq 0.05$) de los tratamientos sobre la velocidad de la elongación de la plántula bajo condiciones normales (cm/día) en espárrago.

	2H-38H	UC157F1	UC115
TESTIGO	0.669 C	0.5926 E	0.6956 A
BUFFER	0.648 C	0.6366 D	0,6325 D
1mM	0.6233 D	0.6799 B	0,6377 D
3mM	0.5628 F	0.609 D	0,6124 D
5mM	0.545 F	0.5161 F	0,5670 F
7mM	0.4748 F	0.4659 F	0,6316 D
9mM	0.6314 D	0.4635 F	0,6371 D

4.9 RELACIÓN PLÚMULA/RADÍCULA

La relación de la longitud plúmula/radícula, el análisis ANVA reveló que los genotipos, la azida de sodio así como la interacción entre ellos manifestaron respuestas diferentes (Cuadro 17).

Cuadro 17. Análisis de variancia de la relación plúmula-radícula en espárrago (Alfa al 0.05).

FV	GL	SC	CM	F-CAL	P-VALOR	SIGN
BLOQUE	3,0000	2,1952	0,7317	0,9696	0,9700	NS
GENOTIPO (G)	2,0000	6,1926	3,0963	4,1029	0,0210	*
DOSIS (D)	6,0000	20,2097	3,3683	4,4634	0,0010	**
G*D	12,0000	38,5895	3,2158	4,2613	0,0001	***
ERROR	60,0000	45,2792	0,7547			
TOTAL	83,0000	112,4662				

CV: 18.751

La prueba Tukey de los genotipos (Figura 20) reveló que la línea 2H-38H (0.6307) expreso la relación más alta; seguido por el cultivar UC 115 (0.5935) y la UC 157 F1 (0.5663). En base a estos resultados se pudo deducir que el crecimiento está orientado hacia la formación radicular, así mismo estas diferencias en la elongación radicular pueden ser atribuidas al desbalance hormonal durante el crecimiento (Joshi *et al.*, 2011).

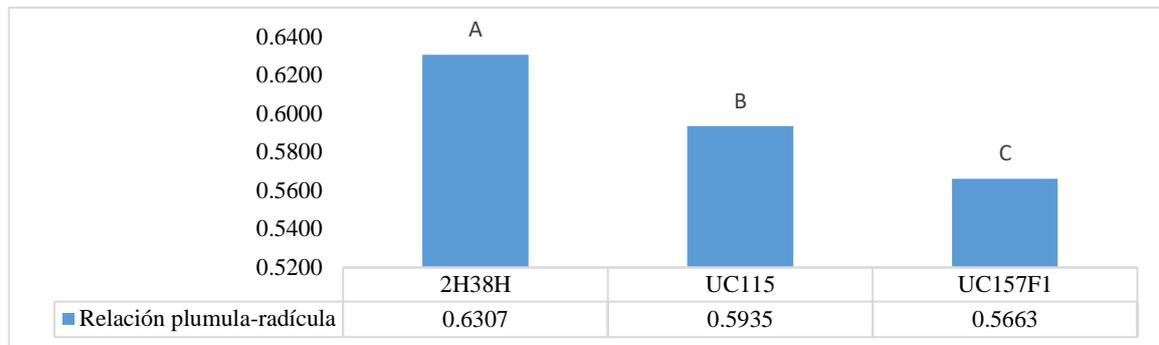


Figura 20. Respuesta de los cultivares de UC 157 F1 y UC 115 y de la línea de espárrago 2H-38H en la relación plúmula/radícula. Prueba Tukey ($p \leq 0.05$)

En la dosis (Figura 21), el análisis Tukey reveló que a partir de la dosis de 5mM se puede apreciar el efecto del agente mutagénico. Los genotipos disminuyeron por lo menos la mitad de la relación de la longitud plúmula-radícula en comparación con el testigo. La relación que se obtienen por parte de estas dosis, se podrían orientar a la obtención de genotipos con tolerancia a sequía, así mismo la dosis de 7mM mantuvo una relación cercana a 1, lo que indicarían un equilibrio hormonal en ambos órganos en relación a la elongación, resultando contradictoria a lo citado por Joshi *et al.* (2011).

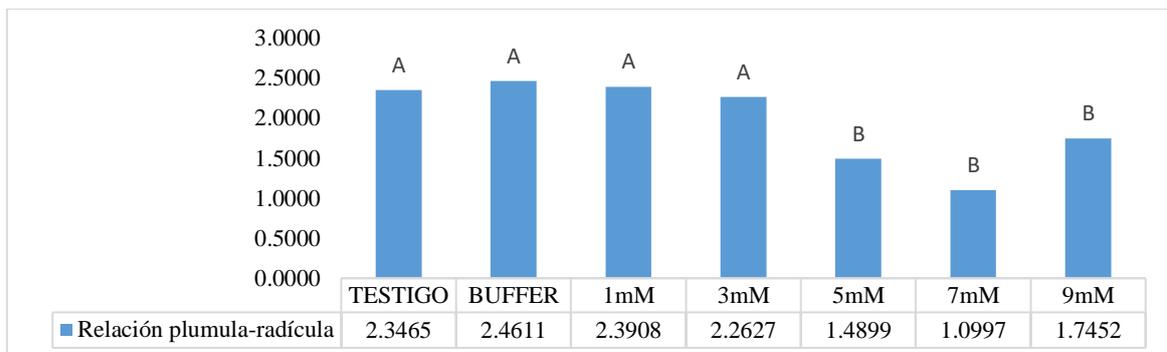


Figura 21. Efecto de las dosis de azida de sodio en la relación plúmula/radícula. Prueba Tukey ($p \leq 0.05$).

En los tratamientos (Cuadro 18), la prueba Tukey reveló que los genotipos tuvieron una relación plúmula/radícula diferentes dependiendo de la dosis de azida de sodio. La línea 2H-38H, la dosis de 3mM superó la relación plúmula/radícula al testigo en 0.3214, mientras que las demás dosis redujeron la relación por debajo del testigo; sin embargo en el cultivar UC 115, las dosis de 1mM (2.7562), 3mM (2.3819) y 9mM (3.0129), la relación fue mayor a los testigos. En el cultivar UC 157 F1 todas las dosis de azida de sodio ocasionaron la reducción de la relación plúmula/radícula, dando a entender que el crecimiento está orientado al área radicular, siendo la dosis de 7mM la que redujo el valor en 0.2917, además se presume una dependencia entre la dosis y la relación plúmula-radícula. El comportamiento variable que

presentaron la línea 2H-38H y el cultivar UC 115 a excepción de la UC 157 F1, aseguran la probabilidad de obtener mutante por ambas direcciones, con alto crecimiento radicular o alto producción de follaje, como la afirma García *et al.* (2011), además las relaciones pueden deberse a un desbalance hormonal (Joshi et al, 2011).

Cuadro 18. Prueba Tukey ($p \leq 0.05$) de los tratamientos sobre la relación plúmula-radícula en espárrago.

	2H-38H	UC157F1	UC115
TESTIGO	2.4587 D	3.2132 A	1.3675 E
BUFFER	2.3636 D	2.908 B	2.1116 E
1mM	1.9012 E	2.515 D	2.7562 C
3mM	2.7801 C	1.626 E	2.3819 D
5mM	1.6673 E	0.6047 E	2.1971 E
7mM	2.1707 E	0.2917 E	0.8366 E
9mM	2.2225 E	0 E	3.0129 B

4.10 DL₅₀

La DL₅₀ nos indica la dosis que permita el 50% de supervivencia de la población y para ello contamos con el cuadro 22 que nos muestra los promedios de la germinación que se obtuvieron durante el experimento (Cuadro 19).

Cuadro 19. Datos promedios por dosis del porcentaje de germinación (%) de cada genotipo y el promedio de los tres para el cálculo de la DL₅₀ en espárrago.

Dosis	2H38H	UC 115	UC 157 F1	Promedio
0mM	92,3	87,3	93,5	91,00
1mM	87,5	77,8	87,00	84,08
3mM	95,5	74,5	80,5	83,50
5mM	41,5	78,00	57,35	59,75
7mM	88,8	60,8	8,7	58,92
9mM	90,8	87,2	1,3	52,75

Para la determinación de la DL₅₀ (Figura 22) se realizó un análisis de regresión, obteniendo lo siguiente: la línea 2H-38H y el cultivar UC 115 las curvas no eran representativas por representar el 1.82% y 5.04% de la variabilidad total respectivamente, mientras el cultivar UC 157 F1 y el promedio de los tres genotipos, las curvas obtenidas representaban el 92.9% y 91.6% de la variabilidad total respectivamente, por lo tanto fueron tomadas para la estimación de la DL₅₀. El cultivar UC 157 F1 la DL₅₀ se obtuvo con la dosis de 4.58mM y el promedio de los tres genotipos con la dosis 9.01mM. El comportamiento de los genotipos 2H38H y UC 115 es similar a lo obtenido por Cletus y Muwa (2014) en *Phyllanthus*

odontadenius, no obtuvieron curvas representativas para determinar la DL₅₀. Las curvas estimadas del cultivar UC 157 F1 y de los genotipos son representativas para la obtención de la DL₅₀; siendo estos resultados similares a los obtenidos por Gnanamurthy *et al.* (2011), en maíz, la DL₅₀ se obtuvo con la dosis de 50mM; además estos resultados pueden ser corroborados por muchos autores cuyos especies investigadas son quimiosensibles a este agente mutagénico (Rao y Reddy, 1986; Srivastava *et al.*, 2011; Elfeky *et al.*, 2014 y Mesah *et al.*, 2007).

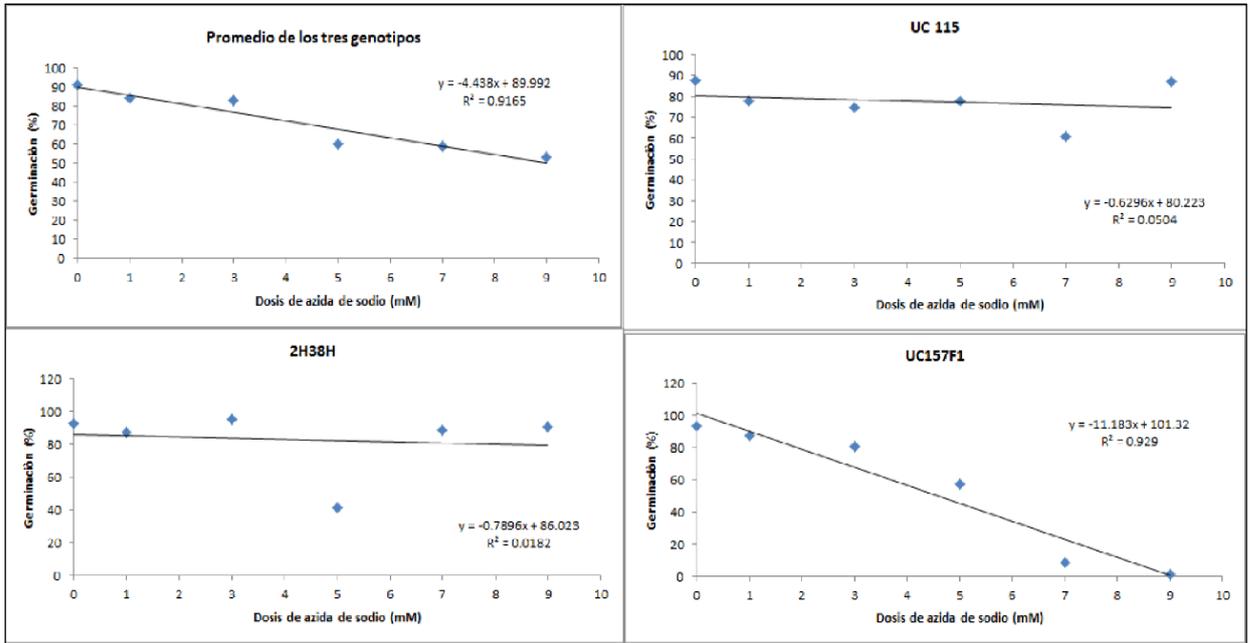


Figura 22. Curvas de regresión y R² de los cultivares UC 157 F1 y UC 115, de la línea 2H-38H y del promedio para la determinación de la DL₅₀.

4.11 EFECTO PROMEDIO DE LA AZIDA DE SODIO EN ESPÁRRAGO

El efecto promedio (Cuadro 20) se determinó de acuerdo a lo postulado por Maluszynski *et al.* (1995), tomando el valor que no sobrepase el 20%, indicando esta estimación cambios genéticos y fisiológicos pero en menor intensidad los morfológicos (Adamu y Aliyu, 2007; Mostafa, 2011), bajo todos estos postulados podemos elegir para el caso del genotipos 2H-38H, la dosis de 9mM con un efecto del 15.213%, para el caso de la UC 115 la dosis de 5mM con el efecto del 19.789% y para la UC 157 F1 y el promedio de los tres genotipos, se seleccionaron la dosis de 3mM con un valor de 29.394% y 24.079% respectivamente.

Cuadro 20. Efecto promedio (%) causado por las dosis de azida de sodio de los cultivares UC 157 F1 y UC 115, línea 2H-38H y el promedio de las tres.

Dosis	2H38H	UC115	UC157F1	promedio
1mM	9,791	14,979	5,721	12,942
3mM	11,088	28,339	29,394	24,079
5mM	36,961	19,789	43,422	35,899
7mM	13,542	39,312	68,058	42,626
9mM	15,213	7,322	79,926	36,015

V. CONCLUSIONES

- Para todas las variables evaluadas durante las etapas de germinación y emergencia de las plántulas hubo efecto de la solución de Azida de sodio.
- Las variables evaluadas durante la germinación y la supervivencia de las plántulas confirman el efecto de la azida de sodio, siendo el genotipo UC 157 F1, el más quimiosensible. Los otros genotipos también fueron afectados en algunas variables evaluadas como se muestran en los resultados.
- La mayoría de las variables tuvieron efecto negativo como reducción en la emergencia, la altura de planta, peso del germinado, mientras que en otros hubo un efecto estimulador como en velocidad de elongación de la raíz, plántula y peso del germinado así como la relación plúmula-radícula
- El efecto promedio de la azida de sodio cercano al 20% para la línea 2H-38H se obtuvo con la dosis de 9 mM (15.213), en el cultivar UC115 con la dosis de 5mM (19.789) y el cultivar UC157F1 se encuentra en la dosis de 3mM (29.394).

VI. RECOMENDACIÓN

Realizar el análisis a nivel molecular para validar los cambios genéticos y continuar con las evaluaciones de la población M1 y M2, para descartar el efecto del medio ambiente.

VII. BIBLIOGRAFIA

1. Adamu, A.; Clung, S. y Abubakar, S. 2004. Effects of ionizing radiation (gamma-rays) on Tomato (*Lycopersicon esculentum* L.). *Nigeria Journal of Experimental and Applied Biology*, 5(2): 185-193.
2. Adamu, A. y Aliyu, H. 2007. Morphological effects of sodium azide on tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill). *Sci. World J.*, 2: 9-12.
3. Adegoke, J. 1984. Bridge induction by sodium azide in *Allium cepa* Nig. *J. Genet.* 5: 86.
4. Agrios, G. 1996. *Fitopatología*. Ed Limusa. Mexico. Página 756.
5. Ali, L.; Bordoloi, N. y Chand, S. 2014. Effect of sodium azide on indigenous rice (*Oryza sativa* L.) varieties of Nagaland. *International Journal of Recent Trends in Science and Technology* August 2014; 12(1): 123-130.
6. Al-Qurainy, F. y Khan, S. 2009. Mutagenic effects of sodium azide and its application in crop improvement. *World Appl. Sci. J.*, 6(12): 1589-1601.
7. Al-Qurainy, F. 2009. Effects of Sodium Azide on Growth and Yield Traits of *Eruca sativa* (L.). *World Applied Sciences Journal* 7 (2): 220-226.
8. Alzamora, H. Espárragos. [En línea]. Instituto Peruano del Espárrago y Hortalizas. [Citado 2006-04-24] Disponible en World Wide web: http://www.ipeh.org/prod_espa_sabiaque.asp.
9. Aminetzach, Y.; Macpherson, J. y Petrov, D. 2005. Pesticide resistance via transposition-mediated adaptive gene truncation in *Drosophila*. *Science*. 309:764-767.
10. Angulo, A. y Weigert, G. 1975. Estados inmaduros de lepidópteros noctuidos de importancia económica en Chile y claves para su determinación (Lepidoptera: Noctuidae). *Boletín de la Sociedad de Biología de Concepción. Publicación especial* 2: 153.
11. Animasaun, D.; Oyedeji, S.; Azeez, M. y Onasanyal, A. 2014. Alkylating efficiency of sodium azide on pod yield, nut size and nutrition composition of samnut 10 and samnut 20 varieties of groundnut (*Arachis hypogea* L.). volume 14 N° 7. Página: 9497- 9510
12. Armstrong, G. y Armstrong, J. 1981. *Formae speciales and races of Fusarium oxysporum causing wilt diseases*. In P. E. Nelson, T. A. Toussoun, & R. J. Cook (Eds.) *Fusarium: Diseases, biology and taxonomy*. Paginas: 392– 399.

13. Blasberg, C. 1932. Phases of the anatomy of asparagus officinalis. Botanical Gazette. Vol: 94. Páginas: 206-214.
14. Bhat, T.; Khan, A. y Parveen, S. 2005. Comparative analysis of meiotic abnormalities induced by gamma rays, EMS and MMS in *Vicia faba* L. J Ind Bot Soc.84:45–8.
15. Bhagwat, B. y Duncan E. 1988. Mutation breeding of banana cv. Highgate (Musa sp., AAA Group) for tolerance to *Fusarium oxysporum* f. sp. Cubense using chemical mutagens. Scientia hortic. 73: 11-22.
16. Bayer. 2011. <http://www.bayercropscience.com.pe/web/index.aspx?articulo=445> citado el 24/09/2014.
17. Bertram, J. 2000. "The molecular biology of cancer". Molecular Aspects of Medicine. Amsterdam, the Netherlands: Elsevier. 21 (6): 167–223.
18. Benmoussa, M.; Mukhopadhyay, S. y Desjardins, Y. 1997. Factors influencing regeneration from protoplasts of *Asparagus densiflorus* cv. Sprengeri, Plant Cell Reports 17:123-128.
19. Bojnauth, G.; Puchooal, S. y Bahorun, T. 2003. In vitro regeneration of *Asparagus officinalis*: Preliminary results. Food and Agricultural Research Council, Réduit, Mauritius. 7-15.
20. Bozzini, A. 1959. Revisión cito-sistemática del género *Asparagus* L. Caryologia 12(2):199-251.
21. Bräse, S.; Gil, C., Knepper, K. y Zimmermann, V. 2005. Organic azide: an ex`loing diversity of a unique class of compounds. Angewandte chemie-VCH Verlag GmbH &Co. kgaA, Weinheim Angew. Chem. Int. ed. 2005, 44, 5188-5240.
22. Briggs, R. y Constatin, M. 1997. Radiation types and radiation sources. In: Manual on Mutation Breeding. 2nd edn. Pagina: 7-20.
23. Burrus, V. y Waldor, M. 2004. "Shaping bacterial genomes with integrative and conjugative elements". Research in Microbiology. Amsterdam, the Netherlands: Elsevier. 155 (5): 376–386.
24. Camadro, E. 1992. Cytological mechanism of 2n microspore formation in garden asparagus. HortScience 27:831-832.
25. Campos, G. y Coletto, R. 1999. Inducción de aberraciones cromosómicas (CA) durante la fase replicativa del genoma (S) por la azida sódica (SA) en meristemos radicales de *Allium cepa*, L. CIENCIA 7(2), 118-125.
26. Campos, f.; Dybas, R. y Krupa D. 1995. Susceptibility of *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) populations in California to abamectin. *Journal Economic Entomology*. 88(2): 225-231.

27. Cardone, S.; Olmos, S. y Echequien, V. 2010. Variación somaclonal En: Biotecnología y mejoramiento vegetal. Capítulo 5. Páginas: 217-241.
28. Castagnino, A.; Diaz, K.; Vasquez, P.; Rosini M. y Sacale, S. 2011. La densidad y tamaño de plántulas con camellón en la producción de espárrago verde. AGRONOMÍA MESOAMERICANA. 22(1):63-70. ISSN: 1021-7444.
29. Castagnino, A.; Rosini, M.; Diaz K.; Gusolis, A. y Maina, M. 2013. Productive evolution of green asparagus at different densities and size of crowns in the period 2005-2008. Revista de Bio ciencias 2(2): 69-82.
30. Castillo, A.; Cistue, L. y Valles, M. 2001. Efficient production of androgenic double-haploid mutants barley by the application of sodium azide to anther and microspore cultures. Plant Cell Reports. 20:105-111.
31. Chang, T. y Hung, L. 1982. The tip-flower character of asparagus (*Asparagus officinalis* L.) I. The morphology and incidence of tip-flower of older seedlings. Mem Coll Agric, Natl Taiwan Univ 22:95-101.
32. Chen, C.; Marcus, A.; Li, W.; Hu, Y.; Vielle, C.; Grossniklaus, U.; Cyr, R. y Ma, H. 2002. The Arabidopsis ATK1 gene is required for spindle morphogenesis in male meiosis. Development 129:2401-2409.
33. Chhun, T.; Taketa, S.; Tsurumi, S. y Ichii, M. 2003. Interaction between two auxin-resistant mutants and their effects on lateral root formation in rice (*Oryza sativa* L.). j. experimental Botany. 393: 2701-2708.
34. Chin, C. 1982. Promotion of shoot and root formation in asparagus in vitro by ancymidol. HortScience 17: 590-591.
35. Cletus, A. y Muwa, S. 2014. Effects of sodium azide (NaN₃) on seed germination, plantlets growth and in vitro antimalarial activities of *Phyllanthus odontadenius* Mull Arg. Asian Journal of Research in Chemistry and Pharmaceutical Sciences. 2(1). Páginas: 15 – 26.
36. Conger, B. 1973. The effects of ascorbic acid and sodium azide on seedling growth of irradiated and non-irradiated barley seeds. Radiation Botany 13: 375-379.
37. Cravero, V.; Martín, E. y Cointry, E. 2007. Genetic Diversity in *Cynara cardunculus* Determined by SRAP Markers. Journal of the American Society for Horticultural Science 132(2):208-212.
38. Crino, P. 1997. Culture filtrate as selective agent of resistance to phytopathogenic fungi. In: Upadhyay RK and Mukerji KG (eds) Toxins in plant disease development and evolving biotechnology. Science Publishers, Inc., USA, pp 183-208.

39. Cubero, J. 2003. Introducción a la mejora genética vegetal. 2da edición, Ed. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España.
40. Dan, Y. & Stephens, C. 1995. The development of asparagus somaclones with high levels of resistance to *Fusarium oxysporum* f.sp. *Asparagi* a *F. proliferatum* plant disease 79. Página: 923.
41. De La Cruz, T.; Rubí M. y Falcón, T. 1994. Evaluación del desarrollo de plantas de aguacate cv Hass sometidas a radiación gamma de ⁶⁰Co. En: Memoria de la Fundación Salvador Sánchez Colín CICTAMEX, S.C. Páginas: 101-112
42. De La Rosa-López, C. 1998. Análisis de Precios y de Cantidad del Espárrago Fresco de Explotación de Caborca, Sonora. Tesis. Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Ed. de México. Página 110.
43. Desjardins, Y. 1984. In vitro rooting of nodal sections of *Asparagus officinalis* L. MScThesis. University of Guelph. Página 96.
44. Dhamayanthi, K. y Reddy, V. 2000. Cytogenetic effects of gamma rays and ethylmethane sulphonate in chili pepper (*Capsicum annuum* L.). *Cytologia*, 65: 129-133.
45. Dharshini, G. 1999. Cell selection, characterization and regeneration of chlorsulfuron-resistant variants in asparagus. Tesis para optar el grado de doctor en la universidad de Lincoln university. Pag 125.
46. Donini, P. y Sonnio, A. 1998. Induced Mutation in Plant Breeding. Current Status and Future Outlook. En Jain, SM. (Ed) Somaclonal Variation and Induced Mutations in Crop Improvement. Páginas: 255-291.
47. Doré, C. 1988. Nouveau regard sur le comportement de l'asperge (*Asparagus officinalis* L.) multipliée in vitro. *Agronomie* 8: 843-850.
48. Elfeky, S.; Abo-Hamad, S. y Saa Allah, K. 2014. Physiological impact of sodium azide on *Helianthus annuus* seedlings. *International Journal of Agronomy and Agricultural Research (IJAAR)*. Vol. 4, No. 5, p. 102-109.
49. El-Kaaby, E.; Abdulkareem E.; Abdulhadi, A.; Abbas, A.; Abdulrazaq, A. y Khalid, A. 2015. Effect of the Chemical Mutagens Sodium Azide on Plant Regeneration of Two Tomato Cultivars under Salinity Stress Condition in vitro. *Journal of Life Sciences* 9: 27-31.
50. Ellison, J. 1986. Asparagus breeding. En: *Breeding vegetable crops* (M.J. Bassett, ed.); AVI Pub. Co.; Westport, CN, USA. Pag 521-540.
51. El-Mokadem, H. y Mostafa, G. 2014. Induction of mutations in *Browallia speciosa* using sodium azide and identification of the genetic variation by peroxidase isozyme. *African Journal of Biotechnology*. Vol. 13(1). Página: 106-111,

52. Endo, R. y Burkholder, E. 1971. The association of *Fusarium moniliforme* with the crown rot complex of asparagus. *Phytopathology* 61: 891.
53. Estrada-Balsadua, J.; Pedraza-Santos, M.; Cruz-Torres, E.; Martínez-Palacios, A.; Sáenz-Romero, C. y morales-García, J. 2011. Effect of ^{60}Co gamma rays in tuberose (*Polianthes tuberosa* L.). *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas Pub. Esp. Núm. 3*. Pag: 445-458.
54. Eze, J. y Dambo, A. 2015. Mutagenic Effects of Sodium Azide on the Quality of Maize Seeds. *Journal of Advanced Laboratory Research in Biology*. Volume VI, Issue III, J. Pag 76-82.
55. Falavigna, A. 2001. La filiera asparago dal campo al consumatore, *Revista L'Informatore Agraria*. Volumen 50. Páginas: 28-29.
56. Flexner. 1995. Experimental evaluation of resistance management for twospotted spider mite (*Acari:Tetranychidae*) on Southern Oregon pear: 1987- 1993. *Journal of Economic Entomology*. 88: 1517-1518.
57. Fernández T.; Mazzeo D. y Marin-Morales M. 2007. Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. *Pest. Biochem. Physiol.* 88, 252-259
58. Fernández, G. y Johnston, 2006 M Fisiología Vegetal Ediciones Universidad de La Serena, La Serena, Chile.
59. Fita, A.; Rodriguez, A. y Prohens, J. 2008. Genética y mejora vegetal. España. Editorial Politecnica de Valencia.
60. García, A.; Porras, I. y Jimenez, J. 2010. Primer congreso peruano de mejoramiento genético y biotecnología agrícola: evaluación de la azida de sodio en la germinación de las semillas de quinua para la inducción de mutaciones. Escuela de postgrado de la Universidad Nacional Agraria La Molina. Pag: 166.
61. Garcilazo, C. (ENTREVISTADO). 2008. El cultivo de esparrago en el Perú. *Revista FRESH PLAZA*. <http://www.freshplaza.es/article/13327/El-cultivo-del-esp%Elrrago-en-el-Per%FA>. (información tomada el 28 de enero del 2015).
62. Gaul, H. y Frimmel, Y. 1972. Efficiency of mutagenesis, in: induced mutation and plant improvement. proceedings of a Study Group Meeting Bs. As. 1970. IAEA, Vienna.
63. Gnanamurthy, S.; Dhanavel, D. y Chidambaram, A. 2011. Frequency in germination studies of chlorophyll mutants in effectiveness and efficiency using chemical mutagens. *Int J Curr Life Sci*, 2(3), 23-27.

64. Gichner, T.; Vactiulov, J. y velemisky, V. 1975. Recovery from Ethyl Methanesulphonate-Induced Genetical Damage in Barley. Independence of Sodium Azide Treatment. *Biologia Plantarum* (Praha). 17 (3) : 202—206.
65. González, M. 1999. Variedades. p. 53-61. Boletín INIA N° 6. El cultivo del espárrago. Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Centro Regional Quilamapu, Chillán, Chile.
66. Goodwin, S. 1995. Relationship between Insecticide – Acaricide resistance and field control in *Tetranychus urticae* (*Tetranychidae*) infesting roses. *Journal of Economic Entomology*. 88 (5):1106 –1112.
67. Grant, W. y Salamone, M. 1994. Comparative mutagenicity of chemicals selected for test in the international program on chemical safety international program on chemical safety collaborative study on plant systems for the detection of environmental mutagens. *Mutation Research- Fundamental and Molecular Mechanism*, 310: 187-209.
68. Grayum, M. 2003. Asparagaceae. In: Manual de Plantas de Costa Rica, B.E. Hammel, M.H. Grayum, C. Herrera & N. Zamora (eds.). *Monogr. Syst. Bot. Missouri Bot. Gard.* 92: 294–295.
69. Gruszka, D.; Szarejko, I.; Maluszynski, M.; Shu, Q.; Forster, B. y Nakagawa, H. 2012. Sodium azide as a mutagen. *Plant mutation breeding and biotechnology*. Páginas: 159-166.
70. Gutierrez, A.; Santacruz, F.; Cabrera, J. y Rodríguez, B. 2003. Mejoramiento genético vegetal in Vitro. e-Gnosis (México) v 1 (1): 1-19.
71. Güvenc, A. y Koyuncu, M. 2002. Studies on the anatomical structure of cladodes of *Asparagus L.* species (Liliaceae) in Turkey. *Isr. J. Plant Sci.* 50, 51-65.
72. Hamouda, H.; Saad-Allah, K. y Kasim, W. 2014. Molecular and physiological responses of *Pisum sativum* and *Vicia faba* to sodium azide. *International Journal of Agronomy and Agricultural Research*. Vol. 4, No. 6. Páginas: 46-61.
73. Hasegawa P.; Murashige, T. y Takatori F. 1973. Propagation of asparagus through shoot apex culture. II. Light and temperature requirements, transplantability of plants, and cyto-histological characteristics. *J Amer Soc Hort Sci* 98:143-148.
74. Heros, E. 1999. Mejoramiento genético de kiwicha (*amaranthus caudatus*) mediante inducción de mutaciones. Tesis. UNALM. Lima. Perú.
75. Huari, P. 2015. Dosimetría de la azida de sodio para determinar el posible efecto mutagénico en semillas y bulbillos de amancay (*ismene amancaes*) tesis para optar para optar el título de ingeniero agrónomo. Universidad Nacional Agraria La Molina. Pag 1-92.

76. Ikhajiagbe, B.; Odigie, U.; Okoh, E. y Agho, E. 2013. Effects of sodium azide on the survival, growth and yield performance of rice (*Oryza sativa*, FARO-57 variety) in a hydrocarbon-polluted soil. *The International Journal of Biotechnology* 2(1):2
77. Ilbas, A.; Eroglu, Y. & Eroglu, H. 2005. Effects of the application of different concentrations of NaN₃ for different times on the morphological and cytogenetic characteristics of barley (*Hordeum vulgare* L.) seedlings. *Journal of Integrative Plant Biology*. 47:1101-1106.
78. Jamsari, A. 2004. BAC-derived diagnostic markers for sex determination in asparagus. *Theoretical and Applied Genetic* 108(6): 1140-1146.
79. Joshi, N.; Ravindran, A. y Mahajan, V. 2011. Investigations on chemical mutagen sensitivity in onion (*Allium cepa*). *INt, K.ot.7*: 243-248.
80. Kanaya, N.; Gill, B.; Grover, I.; Murin, A.; Osiecka, R.; Sandhuf, S. y Anderssong, H. 1994. *Vicia faba* chromosomal aberration assay. Volume 310, Issue 2, 16 October 1994, Pages 231–247.
81. Khan, S.; Al-Qurainy F. y Anwar, F. 2009. Sodium azide: a chemical mutagen for enhancement of agronomic traits of crop plants. *Environ. We Int. J. Sci. Tech.*, 4: 1-21.
82. Khunachack, A.; Chin, C.; Le, T. y Gianfagna, T. 1987. Promotion of asparagus shoots and root growth by growth retardants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 11: 97-111.
83. Kleinhofs, A.; Owais, W. y Nilan, R. 1978. Azide; *Mutation Research*, 55: 165-195.
84. Krarup, A. y Herrera, M. 1987. Germinación, emergencia y desarrollo inicial del espárrago (*Asparagus officinalis* L.) a partir de semillas de distinto diámetro. *Agro Sur*. Página: 26-31.
85. Kochanová, Z.; Ražná, K.; Zuriaga, E.; Badenes, L. y Brindza, J. 2012. Sodium azide induced morphological and molecular changes in persimmon (*Diospyros lotus* L.). *Agriculture (Poľnohospodárstvo)*, 58, (2): 57–64.
86. Konzak, C.; Niknejad, C.; Wickhan, I. y Donaldon, E. 1975. Mutagenic interaction of sodium azide on mutations induced in barley seeds treated with diethyl sulfate or N-methyl- nitrosourea. *Mutation Research*, 30: 5542.
87. Krishna, G.; Shivshankar, G. y Nath, J. 1984. Mutagenic response of Rhodes grass (*Chloris gayana* Kunth.) to gamma rays. *Environ. Exp. Bot.*, 24: 197-205.
88. Kumar, S. 1998. Recessive monogenic mutation in grain pea (*Pisum sativum*) that cause pyridoxine requirement for growth and seed production. *J .Biosci.* 13: 415-418
89. Kumar, G. y Dwivedy, K. 2013. Azide Induced Complementary Effect of Chromosomal Stickiness in *Brassica campestris* L. *Jordan Journal of Biological Sciences*. Volume 6, Number 2. Paginas: 85 – 90.

90. Kunitake, H.; Nakashima, T.; Mori, K. y Tanaka, M. 1998. Somaclonal and chromosomal effects of genotype, ploidy and culture duration in *Asparagus officinalis* L. *Euphytica* 102:309-316.
91. La Republica. 2015. La Libertad ocupa el primer lugar en producción de espárragos. <http://larepublica.pe/economia/879842-la-libertad-ocupa-el-primer-lugar-en-produccion-de-esparragos>. (Citado el 26 de octubre del 2017).
92. Larkin, P. y Scowcroft, W. 1981. Somaclonal variation: A novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theor. Appl. Genet.* 60:197-214.
93. Lassaga, S.; Camadro, E. y Banbicc F. 1998. Assessing genetic variability for *Fusarium* resistance in three asparagus populations with an in vitro assay. *Euphytica* 103: 131-136.
94. Lawrence, C. 1965. Radiation-induced polygenic mutation. In: the use of induced mutation in plants breeding report of the FAO /IAEA, Technical Meeting Held in Rome. Pag 444-445.
95. Londoño, S. 2005. Seminario taller con énfasis en investigación. Manizales: Fundación Universidad Empresa de Caldas. (Noviembre 2 y 3).
96. Maluszynky, M.; Ahloowalia, B. y Sigurbjornsson, B. 1995. Application of in vitro mutation techniques for crop improvement. *Euphytica* 85: 303-315.
97. Marziani, G.; Caporali, E. y Scala, A. 1999. Search for genes involved in asparagus sex determination. En: Sex determination in plants (C.C. Ainsworth, ed.); Bios Scientific Publishers Ltd. Oxford. Páginas: 149-162.
98. Mashenkov, A. 1986. Induced mutation process as a source of new Mutants. *Maize Genetics Cooperation newsletter*, 60: 70-71.
99. Maxim, E.; Capraru, G. y Campeanu, M. 2009. Some cytogenetic effects of sodium azide treatments in caraway root meristems. Páginas: 63-68.
100. Meza, N.; Arizaleta, M. y Bautista, D. 2007. Efecto de la salinidad en la germinación y emergencia de semillas de parchita (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*). *Rev. Fac. Agron., Caracas*. Vol. 24, n. 1, pag. 69-80.
101. Mensah, J. y Obadoni B. 2007. Effects of sodium azide on yield parameters of groundnut (*Arachis hypogaea* L.). *African Journal of Biotechnology* Vol. 6 (6), pp. 668-671.
102. Mensah, J.; Obadoni, B.; Akomeah, P.; Ikhajiagbe, B. y Ajibulu, J. 2007. The effects of sodium azide and Colchicine treatments on morphological and yield traits of sesame seed (*Sesame indicum* L.). *African Journal of Biotechnology*. 6(5): 534-538.

- 103.** Micke, A. 1988. Improvement of Grain Legume Production using Induced mutations IAEA, Vienna pp. 1 – 51.
- 104.** Mikaelson, K. 1980. In “Innovative Approaches to Rice Breeding”.IRRI, Los Banos, Páginas: 67-79.
- 105.** Moh, C. y Nilan, R. 1956. Reduced gene transmission in radiation-induced mutant barley. *J Heredity*, 47:129-131.
- 106.** Montanari, V. 1996. I mezzi tecnici per la coltura in vivaio. *L'Informatore e Agrario*. Página: 25-36.
- 107.** Moreno, R.; Gil, J. y Rubio, J. 2012. Desarrollo de un nuevo germoplasma en la mejora genética del espárrago. *Horticultura Global*. Página: 16-25.
- 108.** Mostafa, G. 2011. Effect of sodium azide on the growth and variability induction in *Helianthus annuus* L. *Int. J. Plant Breed. Genet.*, 5: 76-85.
- 109.** Mroginski, L. 2004. Introducción al Mejoramiento tradicional y la Biotecnología moderna. Ediciones INTA Biotecnología y Mejoramiento Vegetal. Argenbio. Consejo Argentino para la Información y el Desarrollo de la Biotecnología. Pag: 37.
- 110.** Mshembula, B.; Mensah, J. y Ikhajiagbe, B. 2012. Comparative assessment of the mutagenic effects of sodium azide on some selected growth and yield parameters of five accessions of cowpea – Tvu-3615, Tvu-2521, Tvu-3541, Tvu-3485 and Tvu-3574. *Archives of Applied Science Research*. 4 (4):1682-1691
- 111.** Mugnai, S. 1998. Pestrizione Radicale: Effetti Morfo-Fisiologici in Piantini di Pomodoro. (*Lycopersicon esculentum* Mill.) and Tagete (*Tagetes patula* L.). Página 125.
- 112.** Murashige, T.; Shabe, M.; Hasegawa, P.; Takatori, F. y Jones, J. 1972. Propagation of asparagus through shoot apex culture I. Nutrient médium for formation of plantlets. *Journal American Society for Horticultural Science* 97:158-161.
- 113.** Nelson, P.; Toussoun, T. y Cook, R. 1991. Furaium, disease, biology and taxonomy. The Pensilvania State University Press. USA. Pàgina 459.
- 114.** Nilan, R.; Sideris, E.; Kleinhofs, A.; Sander, C. y Konzak, C. 1973. Azide-a potent mutagen. *Mutation Research*, 17: 142-144.
- 115.** Novak, F. y Brunner, H.1992. Plant breeding: Induced mutation technology for crop improvement. IAEA bulletin, 4: 25-33.
- 116.** Ole, O.; Xingzhi, W. y Diter, V. 1993. Sodium azide mutagenesis: Preferential generation of AT -> GC transitions in the barley Antl8 gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Vol. 90, pp. 8043-8047.

- 117.** Olsen, O., Wang, X. y Von Wettstein, D. 1993. Sodium azide mutagenesis: preferential generation of A-T G-C transitions in the barley Ant18 gene. *Proceedings of National Academy of Sciences of the U.S.A.* 90:8043-8047.
- 118.** Olivain, C. y Alabouvette, C. 1997. Colonization of tomato root by a non-pathogenic strain of *Fusarium*. *New Phytologist*. Pàgina 137.
- 119.** Ornstrup, O. 1997. Biotechnological methods in asparagus breeding. *Asparagus Research Newsletter*. Volumen.14. Pàgina: 1-25.
- 120.** Osorio, E. 1972. El mejoramiento genético del trigo en el Brasil y las posibilidades de utilización de mutaciones inducidas. *Induced Mutation and Plant Improvement*. Auspiciado por la FAO/IAEA. Pag: 449-455.
- 121.** Owais, W. y Kleinhofs, A. 1988. Metabolic activation of the mutagen azide in biological systems. *Mutat Res.*, 197:313-323.
- 122.** Pande, S. y Khetmalas M. 2012. Biological Effect of Sodium Azide and Colchicine on Seed Germination and Callus Induction in *Stevia Rebaudiana*". *Asian J. Exp. Biol. Sci.* Vol 3 (1): 93 - 98
- 123.** Papadopoulou, K.; Melton, R.; Leggett, M.; Daniels, M. y Osbourn, A. 1996. Compromised disease resistance in saponin deficient plant. *PNAS*. 96: 12923-12928.
- 124.** Parody, L. 1978. *Enciclopedia argentina de agricultura y jardinería*. Tomo I, Primer volumen, 3ra ed. Editorial ACME. Pàgina 651.
- 125.** Pearson, O.; Sander, C. y Nilan, R. 1975. The effect of sodium azide on cell processes in the embryonic barley shoot. *Rad. Bot.*, 15: 315-322.
- 126.** Pontaroli, A. y Camadro, E. 2005. Somaclonal variation in *Asparagus officinalis* plants regenerated by organogenesis from long-term callus cultures. *Genetics and Molecular Biology*, 28(3), 423-430.
- 127.** Pontaroli, C. 2005. Búsqueda de la Resistencia a *Fusarium proliferatum* en el espàrrago comestible (*Asparagus officinalis* L.) mediante aplicaciones biotecnológicas. Tesis para optar el título de Doctora en Ciencias Agrarias. Universidad Mar Del Plata. Balcarce. Argentina. Pàginas: 25-27.
- 128.** Predieri, S. y Zimmerman, R. 2001. Pear mutagenesis: In vitro treatment with gamma-rays and field selection for productivity and fruit traits. *Euphytica* 117: 217-227.
- 129.** Prohens, J.; Nuez, j. y Carena, C. 2008. *Handbook of Plant Breeding*. Springer Publishing. Pàgina 364.
- 130.** Raicu, P. y Mixich, F. 1992. Cytogenetic effects of sodium azide encapsulated in liposomes on heteroploides cell cultures. *Mutation Research* 283: 215-219.

- 131.** Raimondi, J.; Camadro, E. y Masuelli, R. 2001. Assessment of somaclonal variation in asparagus by RAPD fingerprinting and cytogenetic analyses. *Sci Hortic* 90:19-29.
- 132.** Rao, G. y Rao, V. 1983. Mutagenic efficiency, effectiveness and factor of physical and chemical mutagens in rice. *Cytologia* 48: 427-436.
- 133.** Rao, D. y Reddy, T. 1986. Azide mutagenesis in rice. *Indian Acad. Sci. (Plant Sci.)*. Volume 96, Issue 3, pp 205–215. Volume 54, Issue 2, pag 437–443.
- 134.** Rekha, K. y Langer, A. 2007. Induction and assessment of morpho-biochemical mutants in *Artemisia pallens* Bess. *Genetic Resources and Crop Evolution*.
- 135.** Remotti, P. 1998. Somaclonal variation and in vitro selection for crop improvement. In: Jain SM, Brar DS and Alhoowalia BS (eds) *Somaclonal Variation and Induced Mutations in Crop Improvement*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London. Página: 169-201
- 136.** Ricardo, M. y Ando, A. 1998. Effects of gamma-radiation and sodium azide on quantitative characters in rice (*Oryza sativa* L.). *Genetics of Molecular Biology*, 21(1): 244-251.
- 137.** Rines, H. 1985. Sodium azide mutagenesis in diploid and hexaploid oats and comparison with ethyl methane sulfonate treatments. *Environmental and Experimental Botany*, 25: 7-16
- 138.** Robb, A. 1984. Physiology of asparagus (*Asparagus officinalis* L.) as related to the production of the crop. *NZ J Exp Agric* 12: 251-260.
- 139.** Rubatzky, V. y Yamaguchi, M. 1997. *World Vegetables (Principles, Production and Nutritive Values)*. International Thomson Publishing, 2nd Edn., New York, USA. Página 843.
- 140.** Rubí M., De la Cruz, E. y Trujillo, R. 1995. Mejoramiento genético del aguacate mediante mutagénesis radioinducida. En: [www:http://www.avocadosource.com/journals/cictamex/cictamex_1995/fitos_2_95_pdf.](http://www.avocadosource.com/journals/cictamex/cictamex_1995/fitos_2_95_pdf;); Consulta: Octubre de 2016.
- 141.** Sahasrabudhe, A.; Pande, A. y Modi, V. 1991. Dehalogenation of a mixture of chloroaromatics by immobilized *Pseudomonas* sp. US1 ex cells. *Applied Microbiology and Biotechnology*. Volume 35, Issue 6, pp 830–832.
- 142.** Salim, K.; Al-Quainy, F. y Anwar, F. 2009. Sodium azide: a chemical mutagen for enhancement of agronomic traits of crop plants. *An International Journal of Science and Technology* 4, 1-21.
- 143.** Salaz, L. 2015. La azida de sodio aplicada a las semillas (*Salvia Farinacea* Benth. Var. Blu Bedder) para cambios genéticos. Tesis, Lima, Peru 35-36.
- 144.** Sander, C.; keinhofs, A.; konzak C. y Nilan, R. 1972. Kinetic studies on the induction of the inhibition of repair of radiation damage in barley. *Barley Genetic Newsletter*, 2:71.

- 145.** Sander, C.; Nillan, R.; Kleinhofs, S. y Vig, B. 1978. Mutagenic and chromosome-breaking effects of azide in barley and human leukocytes. *Mutation Research*, 50: 67-76.
- 146.** Sander, C. y Muehlbauer, F. 1977. Mutagenic effects of sodium azide and gamma irradiation in *Pisum*. In *Environmental and Experimental Botany*, vol. 17, 1977, no. 1. Páginas: 43–45.
- 147.** Sardina, P. 2007. The power of mutagénesis. *Science*. Pagina 2.
- 148.** Shelton, L.; Ashby, J. y De Marini, D. 1994. Mutation spectrum of a binary mixture of mutagens (methapyrilene and sodium azide) in strain TA1535 of *Salmonella*. *Mutat Res* 323:35-39.
- 149.** Schreuder, W. y Lamprecht, S. 1995. Pathogenicity of three *Fusarium* species with asparagus decline in South Africa. *Plant Disease* 79: 177- 181
- 150.** Shigeta, J.; Mori, T.; Toda, K. y Ohtake H. 1990. Effect of capsule hardness on germination frequency of encapsulated somatic embryos of carrot. *Biotech*. Páginas: 21–24.
- 151.** Sideris, E.; Nilan, R. y Bogyo, T. 1973. Differential effect of sodium azide on the frequency of radiation-induced chromosome aberrations vs. the frequency of radiation-induced chlorophyll mutations in *Hordeum vulgare*. *Radiation Botany*. 13(6):315-322
- 152.** Sideris, E. y Argyrakis, M. 1974. Chemical alterations induced in DNA and DNA components by the mutagenic agent azide. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) -Nucleic Acids and Protein Synthesis*, 366(4):367-373.
- 153.** Silva, A. y Marinho, V. 1962. Experimento de Indução de mutacáo em trigo pela energí nuclear, agropecuario, Boletim Técnico de DANV, EAEM .
- 154.** Sparks, C, 1981. Development of insecticide resistance in *Heliothis zea* and *Heliothis virescens* in North America. *Bull Entomol Soc Am* 27:186–192.
- 155.** Smaka- kindle, D.; Stegnar, M. y Toman, J. 1996.the evaluation of waste, surface and ground water quality using the *Allium* test procedure. *Mutation Res*. 368: 171-179.
- 156.** Srivastava, P.; Marker, S.; Pande, P. y Tiwari, Z. 2011. Mutagenic effects of sodium azide on the growth and yield characteristics in wheat (*Triticum aestivum* L. em. Thell). *Asian J Plant Sci.*, 10(3): 190-201
- 157.** Stajner, N.; Bohanec, B. y Marijana, J. 2002. In vitro propagation of *Asparagus maritimus* a rare Mediterranean salt-resistant species. *Plant Cell Tiss. Org.*, 70: 269-274.
- 158.** Shu, Q.; Shirasawa, K.; Hoffmann, M.; Hurlebaus, J. y Nishio, T. 2012. Mutation techniques and methods for mutation detection and screening in plants. In: Shu, Q.; Foster, B. y Nakagawa, H. (eds) *Plants Mutation breeding and biotechnology*. CABI, Wallingford, pp 241-256.
- 159.** Suarez, E. 2006. Mejoramiento genético mediante inducción de mutaciones. I curso de capacitación en mejoramiento genético en arroz. Cuba. Página 12.

- 160.** Umar, M.; Dahot, E. y Rafiq, M. 2011. Physical and biochemical analysis of sodium azide treated sorghum bicolor (L.) monech. Pak. J. Biotechnol. Vol. 8 (2) 67 – 72.
- 161.** USDA. 2003. Memorandum of understanding between the United States Department of Agriculture and the Office of the United States Trade Representative, and the Secretariat of Agriculture, Livestock, Rural Development, Fisheries and Food and the Secretariat of Economy of the United Mexican States regarding areas of food and agricultural trade [web en línea]. Disponible desde Internet: <http://www.usda.gov/news/releases/2002/04/moumexico.htm> [con acceso el 14 de marzo de 2014].
- 162.** Van, D. y Inouye, Ê. 1991. Regulation of movement speed by intracellular pH during Dictyostelium discoideum Chemotaxis. Proceeding of the National Academy Sciences U.S.A 88: 4951-4955.
- 163.** Van Harten, A. 1998. Mutation breeding: Theory and Practical Applications. Cambridge Univ. Press; Cambridge.
- 164.** Veleminsky, J. y Anglis, K. 1987. Effect of sodium azide on replicative and repair DNA synthesis in barley embryos. Mutation Research, 190: 125-129.
- 165.** Wien, C. 1997. The Physiology of Vegetable Crops. Editorial Cab International. New York, NY, U.S.A.
- 166.** Yang, W. y Clore, H. 1973. Rapid vegetative propagation of asparagus through lateral bud culture HortScience. Pàginas: 141–143.
- 167.** Zagaya, W. y Przybila, A. 1976. Compact type mutants in apples and sour cherries. Mutation Breeding Newsletter. 8:8-9.
- 168.** Zhang, B. 2000. Regulation of plant growth regulators on cotton somatic embryogenesis and plant regeneration. Biochemistry, 39: 1567-1567.

VIII. ANEXOS

Cuadro 21. Resultados del análisis de regresión, para la estimación de la velocidad de elongación de la altura de planta por repetición-tratamiento del cultivar UC 115.

DOSIS (Y)	REP.	a	VELOCIDAD (b)	TIEMPO (X)	R ² (%)
TESTIGO	R1	-4.134	0.6699	DIAS	82.7
	R2	-4.014	0.6585	DIAS	83.3
	R3	-4.196	0.6713	DIAS	82.4
	R4	-4.139	0.6759	DIAS	83.2
BUFFER	R1	-4.065	0.6533	DIAS	82.7
	R2	-3.959	0.6318	DIAS	81.5
	R3	-4.101	0.6538	DIAS	82.1
	R4	-4.036	0.6523	DIAS	79
1mM	R1	-3.86	0.6214	DIAS	82.3
	R2	-3.872	0.6257	DIAS	81.5
	R3	-3.911	0.6014	DIAS	79.3
	R4	-4.153	0.6441	DIAS	80.1
3mM	R1	-3.643	0.5625	DIAS	79.6
	R2	-3.614	0.5404	DIAS	77.3
	R3	-3.769	0.5773	DIAS	79.1
	R4	-3.692	0.5714	DIAS	79.8
5mM	R1	-3.688	0.5521	DIAS	76.8
	R2	-3.6	0.5218	DIAS	74.2
	R3	-3.667	0.5575	DIAS	78.6
	R4	-3.631	0.5479	DIAS	78
7mM	R1	-3.286	0.4767	DIAS	74.3
	R2	-3.226	0.4671	DIAS	73.8
	R3	-3.301	0.4759	DIAS	73
	R4	-3.261	0.4786	DIAS	75
9mM	R1	-3.772	0.5979	DIAS	81.6
	R2	-4.015	0.651	DIAS	83
	R3	-3.995	0.6348	DIAS	81.8
	R4	-3.988	0.6415	DIAS	82.5

Cuadro 22. Resultados del análisis de regresión, para la estimación de la ganancia de peso del germinado por repetición-tratamiento del cultivar UC 115.

DOSIS (Y)	REP.	a	VELOCIDAD (b)	TIEMPO (x)	R ² (%)
TESTIGO	R1	-0.01162	0.003134	DIAS	92.9
	R2	-0.01193	0.003152	DIAS	93.1
	R3	-0.0009398	0.003117	DIAS	82
	R4	-0.01562	0.003746	DIAS	92.1
BUFFER	R1	-0.009015	0.002598	DIAS	89.9
	R2	-0.007315	0.002303	DIAS	87.5
	R3	-0.01046	0.002838	DIAS	91.3
	R4	-0.01239	0.003172	DIAS	92
1mM	R1	-0.01463	0.002624	DIAS	79.5
	R2	-0.0161	0.003116	DIAS	89.2
	R3	-0.01518	0.00234	DIAS	78
	R4	-0.01279	0.002321	DIAS	84.2
3mM	R1	-0.01332	0.002196	DIAS	83.5
	R2	-0.01566	0.002442	DIAS	77.9
	R3	-0.01452	0.002281	DIAS	77.8
	R4	-0.01549	0.002484	DIAS	74.8
5mM	R1	-0.01536	0.002471	DIAS	80.3
	R2	-0.01606	0.00249	DIAS	77.9
	R3	-0.01339	0.002102	DIAS	78.1
	R4	-0.01408	0.001942	DIAS	61.8
7mM	R1	-0.01345	0.002173	DIAS	77.1
	R2	-0.0131	0.002032	DIAS	71.1
	R3	-0.01012	0.001338	DIAS	58.6
	R4	-0.0113	0.001541	DIAS	60.2
9mM	R1	-0.01149	0.002915	DIAS	91.7
	R2	-0.009333	0.002891	DIAS	86.8
	R3	-0.01142	0.002841	DIAS	90.6
	R4	-0.01028	0.002802	DIAS	90.6

Cuadro 23. Resultados del análisis de regresión, para la estimación de la velocidad de elongación de la raíz por repetición-tratamiento del cultivar UC 115.

DOSIS (Y)	REP.	a	VELOCIDAD (b)	TIEMPO (X)	R ² (%)
TESTIGO	R1	-0.8933	0.1808	DIAS	86.8
	R2	-0.8419	0.1782	DIAS	83.6
	R3	-0.6354	0.1375	DIAS	82.1
	R4	-1.065	0.1964	DIAS	84.9
BUFFER	R1	-0.6002	0.1111	DIAS	87.9
	R2	-0.3977	0.08223	DIAS	85.8
	R3	-0.331	0.07014	DIAS	89.2
	R4	-0.304	0.06702	DIAS	83.5
1mM	R1	-0.4776	0.07131	DIAS	72.8
	R2	-0.3474	0.06602	DIAS	78.9
	R3	-0.3856	0.5656	DIAS	73.6
	R4	-0.4406	0.07487	DIAS	79.5
3mM	R1	-0.4006	0.06038	DIAS	75
	R2	-0.3139	0.04471	DIAS	70.4
	R3	-0.3364	0.05093	DIAS	72.7
	R4	-0.3508	0.05107	DIAS	68.4
5mM	R1	-0.349	0.05056	DIAS	65.1
	R2	-0.3969	0.05668	DIAS	54.8
	R3	-0.3022	0.04249	DIAS	58.6
	R4	-0.3682	0.0484	DIAS	58.5
7mM	R1	-0.4563	0.06534	DIAS	72.3
	R2	-0.3484	0.04852	DIAS	67.9
	R3	-0.1276	0.01697	DIAS	57
	R4	-0.1027	0.01362	DIAS	56.4
9mM	R1	-0.3378	0.07023	DIAS	80.3
	R2	-0.6444	0.1068	DIAS	61.6
	R3	-0.3232	0.06703	DIAS	76
	R4	-0.3024	0.06748	DIAS	73.8

Cuadro 24. Resultados del análisis de regresión, para la estimación de la velocidad de elongación de la plántula por repetición-tratamiento de la línea 2H-38H.

DOSIS (Y)	REP.	a	VELOCIDAD (b)	TIEMPO (X)	R ² (%)
TESTIGO	R1	-3.6490	0.6508	DIAS	87.7
	R2	-4.0370	0.6663	DIAS	84.3
	R3	-4.6590	0.7815	DIAS	71.9
	R4	-3.8090	0.6840	DIAS	87.5
BUFFER	R1	-3.6670	0.6924	DIAS	87.5
	R2	-3.5870	0.6525	DIAS	88.8
	R3	-3.7620	0.5821	DIAS	78.9
	R4	-3.7740	0.6060	DIAS	81.9
1mM	R1	-3.7810	0.6673	DIAS	87
	R2	-3.7380	0.6426	DIAS	86.5
	R3	-3.7890	0.6327	DIAS	85.2
	R4	-3.6800	0.6085	DIAS	83
3mM	R1	-3.6190	0.6011	DIAS	84.5
	R2	-3.4480	0.5829	DIAS	85.8
	R3	-4.1670	0.6584	DIAS	80.3
	R4	-3.6710	0.6075	DIAS	84.4
5mM	R1	-2.8490	0.4244	DIAS	74.1
	R2	-3.8870	0.6310	DIAS	82.6
	R3	-3.6920	0.6127	DIAS	83.4
	R4	-3.5990	0.6001	DIAS	84.2
7mM	R1	-3.7510	0.6476	DIAS	86.3
	R2	-3.8620	0.6661	DIAS	87
	R3	-3.6920	0.6127	DIAS	83.4
	R4	-3.5990	0.6001	DIAS	84.2
9mM	R1	-3.6420	0.6407	DIAS	87.5
	R2	-3.8510	0.6291	DIA	82.8
	R3	-3.6970	0.6306	DIA	86.7
	R4	-3.9440	0.6483	DIA	84.5

Cuadro 25. Resultados del análisis de regresión, para la estimación de la ganancia de peso del germinado por repetición-tratamiento de la línea 2H-38H.

DOSIS (Y)	REP.	a	VELOCIDAD (b)	TIEMPO (x)	R ² (%)
TESTIGO	R1	0.0000	0.0043	DIA	93.8
	R2	0.0011	0.0046	DIA	97.4
	R3	0.0001	0.0046	DIA	95.2
	R4	0.0001	0.0047	DIA	90.2
BUFFER	R1	0.0044	0.0043	DIA	94.3
	R2	0.0069	0.0037	DIA	83.8
	R3	-0.0029	0.0044	DIA	97.9
	R4	-0.0002	0.0046	DIA	95.9
1mM	R1	-0.0024	0.0047	DIA	83.5
	R2	-0.0015	0.0046	DIA	85.5
	R3	0.0015	0.0040	DIA	94.3
	R4	-0.0025	0.0046	DIA	88.6
3mM	R1	-0.0098	0.0041	DIA	88
	R2	-0.0105	0.0040	DIA	89.1
	R3	-0.0055	0.0036	DIA	87.9
	R4	-0.0012	0.0034	DIA	90.6
5mM	R1	-0.0121	0.0038	DIA	89.9
	R2	-0.0013	0.0035	DIA	86
	R3	-0.0144	0.0043	DIA	89.4
	R4	-0.0103	0.0028	DIA	80.4
7mM	R1	-0.0034	0.0044	DIA	94.7
	R2	-0.0034	0.0045	DIA	91.4
	R3	-0.0144	0.0043	DIA	89.4
	R4	-0.0121	0.0061	DIA	82.4
9mM	R1	-0.0131	0.0050	DIA	94.9
	R2	-0.0126	0.0043	DIA	87.5
	R3	-0.0100	0.0041	DIA	91.5
	R4	-0.0162	0.0034	DIA	88.7

Cuadro 26. Resultados del análisis de regresión, para la estimación de la velocidad de elongación de la raíz por repetición-tratamiento de la línea 2H-38H.

DOSIS (Y)	REP.	a	VELOCIDAD (b)	TIEMPO (x)	R ² (%)
TESTIGO	R1	-0.1931	0.0922	DIA	95.5
	R2	-0.1323	0.0893	DIA	92.2
	R3	-0.0576	0.0788	DIA	84.2
	R4	-0.0732	0.0809	DIA	89.6
BUFFER	R1	-0.0215	0.1249	DIA	86.9
	R2	-0.1415	0.1084	DIA	93.9
	R3	0.0058	0.0424	DIA	72.7
	R4	-0.1544	0.0930	DIA	80.1
1mM	R1	-0.2018	0.1140	DIA	80.4
	R2	-0.1203	0.0814	DIA	77.7
	R3	-0.2864	0.1231	DIA	87.2
	R4	-0.3315	0.1332	DIA	90.7
3mM	R1	-0.2157	0.0756	DIA	87.2
	R2	-0.2371	0.0756	DIA	86.9
	R3	-0.2447	0.0937	DIA	85.5
	R4	-0.1810	0.0872	DIA	85
5mM	R1	-0.2649	0.0648	DIA	85.6
	R2	-0.3822	0.0832	DIA	70.1
	R3	-0.2194	0.0564	DIA	84.1
	R4	-0.1768	0.0401	DIA	73.5
7mM	R1	-0.0237	0.0105	DIA	86.4
	R2	-0.1565	0.0914	DIA	80.7
	R3	-0.1742	0.0913	DIA	87.7
	R4	-0.1053	0.0839	DIA	84.6
9mM	R1	-0.1740	0.0695	DIA	86.7
	R2	-0.3053	0.0894	DIA	80.5
	R3	-0.1911	0.0602	DIA	88.2
	R4	-0.2209	0.0641	DIA	85.7

Cuadro 27. Resultados del análisis de regresión, para la estimación de la velocidad de elongación de la plántula por repetición-tratamiento del cultivar UC 157 F1.

DOSIS (Y)	REP.	a	VELOCIDAD (b)	TIEMPO (x)	R ² (%)
TESTIGO	R1	-3.1460	0.5279	DIAS	93.1
	R2	-3.0670	0.6885	DIAS	97.2
	R3	-1.4890	0.5279	DIAS	95.4
	R4	-2.3620	0.6261	DIAS	96.6
BUFFER	R1	-4.0960	0.6710	DIAS	90.8
	R2	-3.6440	0.6509	DIAS	93.2
	R3	-2.7650	0.6162	DIAS	93.7
	R4	-3.3780	0.6085	DIAS	91.7
1mM	R1	-3.6190	0.6788	DIAS	94.7
	R2	-3.7460	0.6718	DIAS	92.2
	R3	-4.1130	0.7097	DIAS	92.5
	R4	-3.7100	0.6594	DIAS	92.9
3mM	R1	-3.6150	0.5116	DIAS	90.1
	R2	-5.0970	0.6945	DIAS	84
	R3	-4.9530	0.6808	DIAS	85.5
	R4	-3.2700	0.5493	DIAS	90.1
5mM	R1	-4.3920	0.5458	DIAS	76.4
	R2	-4.1690	0.5583	DIAS	83.3
	R3	-3.0610	0.3932	DIAS	75.3
	R4	-4.1930	0.5671	DIAS	84.2
7mM	R1	-3.2030	0.4113	DIAS	81.4
	R2	-3.7730	0.5135	DIAS	84.9
	R3	-3.9140	0.5330	DIAS	82.7
	R4	-3.2020	0.4059	DIAS	79.4
9mM	R1	-4.2390	0.5236	DIAS	78.2
	R2	-3.5660	0.4467	DIAS	79.1
	R3	-3.3670	0.4359	DIAS	77.2
	R4	-3.3950	0.4478	DIAS	82.5

Cuadro 28. Resultados del análisis de regresión, para la estimación de la ganancia de peso del germinado por repetición-tratamiento del cultivar UC 157 F1.

DOSIS (Y)	REP.	a	VELOCIDAD (b)	TIEMPO (x)	R ² (%)
TESTIGO	R1	0.0071	0.0042	DIAS	91.7
	R2	0.0052	0.0043	DIAS	92.8
	R3	0.0106	0.0039	DIAS	75.7
	R4	-0.0007	0.0053	DIAS	92.7
BUFFER	R1	0.0077	0.0035	DIAS	61.4
	R2	0.0044	0.0045	DIAS	88.8
	R3	0.0086	0.0031	DIAS	83.5
	R4	0.0003	0.0050	DIAS	94.1
1mM	R1	-0.0125	0.0042	DIAS	92.7
	R2	-0.0182	0.0050	DIAS	95.7
	R3	-0.0116	0.0039	DIAS	93.8
	R4	-0.0191	0.0053	DIAS	94.1
3mM	R1	-0.0178	0.0049	DIAS	76.7
	R2	-0.0190	0.0037	DIAS	76.1
	R3	-0.0153	0.0035	DIAS	80.5
	R4	-0.0207	0.0044	DIAS	93.4
5mM	R1	-0.0160	0.0026	DIAS	74.8
	R2	-0.0200	0.0039	DIAS	88.5
	R3	-0.0153	0.0026	DIAS	77.9
	R4	-0.0218	0.0038	DIAS	79.7
7mM	R1	-0.0137	0.0022	DIAS	67.7
	R2	-0.0141	0.0024	DIAS	76.7
	R3	-0.0110	0.0017	DIAS	66.4
	R4	0.0016	0.0002	DIAS	63.2
9mM	R1	-0.0012	0.0003	DIAS	58.9
	R2	-0.0019	0.0003	DIAS	27.3
	R3	0.0000	0.0000	DIAS	0
	R4	-0.0028	0.0004	DIAS	27.3

Cuadro 29. Resultados del análisis de regresión, para la estimación de la velocidad de elongación de la raíz por repetición-tratamiento del cultivar UC 157 F1.

DOSIS (Y)	REP.	a	VELOCIDAD (b)	TIEMPO (x)	R ² (%)
TESTIGO	R1	0.00785	0.0715	DIAS	89.3
	R2	0.06055	0.0475	DIAS	80
	R3	-0.0297	0.06509	DIAS	82.1
	R4	0.05859	0.05984	DIAS	91.6
BUFFER	R1	0.06455	0.05375	DIAS	83.4
	R2	0.03691	0.07454	DIAS	89.9
	R3	-0.0016	0.07175	DIAS	80
	R4	0.0439	0.06838	DIAS	84.5
1mM	R1	-0.03268	0.0307	DIAS	83.7
	R2	0.1939	0.07491	DIAS	93.7
	R3	-0.355	0.1074	DIAS	90
	R4	-0.1583	0.06751	DIAS	88.8
3mM	R1	-0.1954	0.05756	DIAS	80.1
	R2	-0.1498	0.03068	DIAS	66.4
	R3	-0.1731	0.03818	DIAS	69.2
	R4	-0.1293	0.03589	DIAS	81
5mM	R1	-0.2076	0.0381	DIAS	50
	R2	-0.2248	0.052	DIAS	81.9
	R3	-0.1936	0.03594	DIAS	51.9
	R4	-0.191	0.03778	DIAS	60.5
7mM	R1	-0.07945	0.01445	DIAS	45.2
	R2	-0.05241	0.01084	DIAS	68.5
	R3	-0.02114	0.003586	DIAS	28.1
	R4	-0.02745	0.005009	DIAS	42.4
9mM	R1	-0.004636	0.00106	DIAS	79.6
	R2	-0.004091	0.000682	DIAS	25
	R3	0.0000	0.0000	DIAS	0
	R4	-0.01045	0.001741	DIAS	25