



Esta obra está bajo una [Licencia Creative Commons Atribución- NoComercial-CompartirIgual 2.5 Perú](http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.5/pe/).
Vea una copia de esta licencia en <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.5/pe/>

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN MARTÍN-TARAPOTO

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

DEPARTAMENTO ACADEMICO AGROSILVO PASTORIL



TESIS:

**“ESTUDIO DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA EN POBLACIONES
NATURALES DE SACHA INCHI *Plukenetia volubilis* L.
(EUPHORBIACEAE) DE LA REGIÓN SAN MARTÍN”**

PRESENTADO POR EL BACHILLER:

MIKE ANDERSON CORAZON GUIVIN

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

INGENIERO AGRÓNOMO

TARAPOTO - PERÚ

2009

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN MARTÍN-TARAPOTO
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
DEPARTAMENTO ACADÉMICO AGROSILVO PASTORIL
ÁREA DE MEJORAMIENTO Y PROTECCIÓN DE CULTIVOS

TESIS:

**“ESTUDIO DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA EN POBLACIONES
NATURALES DE SACHA INCHI *Plukenetia volubilis* L.
(EUPHORBIACEAE) DE LA REGIÓN SAN MARTIN”**

PRESENTADO POR EL BACHILLER:

MIKE ANDERSON CORAZON GUIVIN

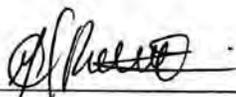
MIEMBROS DEL JURADO



Ing. M.Sc. Javier Ormeño Luna
Presidente



Ing. Elías Torres Flores
Secretario



Ing. María Emilia Ruiz Sánchez
Miembro



Ing. M.Sc. Guillermo Vásquez Ramírez
Asesor



Dra. Carmen Rosa García Dávila
Co-asesor

DEDICATORIA



En mi no cabe una palabra que pueda expresar el agradecimiento que siento a mi familia y en especial a mis padres AMPARO Y EXSEQUIEL, por haber puesto todo su empeño en salir adelante, por ese día a día de constancia y mucho sacrificio por alcanzar sus objetivos, para poder brindarme lo mejor de su esfuerzo. Gracias por regalarme una carrera para mi futuro, por ser un ejemplo de admiración y superación, por creer en mí en todo momento, nunca los defraudaré.

Los quiero con todo mi corazón y este trabajo que me llevó más de un año realizarlo es para ustedes con mucho amor. Sin olvidar a mis queridos hermanos Fiorella y Fernando con quienes compartí los mejores años de mi infancia, siempre estarán en mi corazón.

MIKE ANDERSON CORAZON GUIVIN

AGRADECIMIENTO

A ti Dios que me diste la oportunidad de vivir y de regalarme una familia maravillosa, gracias por hacer posible el cumplimiento de este objetivo.

Al Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana (IIAP), y en especial al Laboratorio de Biología y Genética Molecular (PIBA), por brindarme la oportunidad de poder realizar la tesis de pregrado.

A la Dra. Carmen Rosa García Dávila; Jefa del Laboratorio de Biología y Genética Molecular (IIAP), por el asesoramiento de este trabajo de investigación, gracias por compartir sus conocimientos, tiempo, dedicación y su amistad, para poder lograr el cumplimiento este objetivo.

Al Dr. Jean François Renno (IRD), por su dedicación y recomendaciones en la redacción de éste trabajo de investigación.

Al Ing. M.Sc. Guillermo Vásquez Ramírez, por el asesoramiento en el presente trabajo de investigación.

Al Ing. Danter Cachique Huansi, por brindarme su amistad, sus consejos y apoyo para la realización de este trabajo.

A los M. Sc. Juan Pablo Torrico y Fernando Carbajal Vallejo por su amistad y los consejos impartidos durante la ejecución del presente trabajo.

Al Dr. Dennis Del Castillo Torres, por su apoyo en todo momento y por estar pendiente del desarrollo de esta investigación.

Al Dr. Víctor Erasmo Sotero Solís, por su amistad y por crear un ambiente agradable en todo momento con su buen humor.

A mis amigos del laboratorio: Werner, Diana, Javier, Ángel Martín, Adriana, Jorge, Evelyn, Adela, Gian Carlo, Dorian, Kevin, Karin, Antonio, Antonia, Frank, Juan Carlos, Martha, Liliana, Pedro, Erika, Andrés, Mara y Claudia; a todos ellos gracias, por formar una familia muy especial de trabajo, por compartir mi estancia en esta ciudad, haciéndola más agradable y placentera, y sobre todo por brindarme su más sincera amistad, nunca los olvidaré.

Sin olvidar a mis amigos del IIAP – San Martín: Geomar, Manuel, Juan Carlos, Henry, Marcos, Héctor, Vanessa, Michael, Americo, Clavelita y Eliska, muchos de ellos promociones de estudio con quienes compartí experiencias muy lindas de aprendizaje, como también otros que me brindaron su apoyo en todo momento.

ÍNDICE

	Pág.
I. INTRODUCCIÓN.....	01
II. OBJETIVOS.....	03
III. REVISIÓN DE LITERATURA.....	04
3.1. DEL CULTIVO DE SACHA INCHI.....	04
3.1.1. Clasificación botánica.....	04
3.1.2. Descripción taxonómica de la familia Euphorbiaceae.....	04
3.1.3. Descripción morfológica.....	05
3.1.4. Distribución en el Perú.....	06
3.1.5. Distribución en América.....	07
3.1.6. Ecología.....	07
3.1.7. Utilización tradicional e importancia nutricional.....	08
3.1.8. Investigaciones agronómicas en el cultivo.....	09
3.2. ESTRUCTURA GENÉTICA DE POBLACIONES.....	11
3.3. FACTORES QUE DETERMINAN LA ESTRUCTURACIÓN GENÉTICA.....	11
3.3.1. Deriva genética.....	11
3.3.2. Selección natural.....	12
3.3.3. Mutación.....	13
3.3.4. Flujo genético.....	14
3.4. USO DE ADN EN ESTUDIOS GENÉTICOS.....	14
3.5. MARCADORES MOLECULARES Y SU IMPORTANCIA.....	15
3.6. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).....	16
3.7. AMPLIFICACIÓN DIRECTA DE POLIMORFISMO DE LONGITUD (DALP).....	17
IV. MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
4.1. MATERIALES.....	20
4.1.1. Materiales de vidrio.....	20
4.1.2. Materiales de plástico.....	20
4.1.3. Material biológico.....	20
4.1.4. Reactivos.....	20
4.1.5. Equipos.....	21
4.2. METODOLOGÍA.....	22
4.2.1. Área de estudio.....	22
4.2.2. Colecta, codificación y conservación del material biológico.....	23
4.2.3. Área de trabajo.....	24

4.2.4.	Extracción de ADN.....	24
4.2.5.	Verificación del ADN extraído.....	25
	<i>Espectrofotometría.....</i>	25
	<i>Electroforesis.....</i>	25
4.2.6.	Amplificación del ADN (DALP) vía PCR.....	26
4.2.7.	Electroforesis de los productos de amplificados.....	27
	<i>Gel de agarosa 2%.....</i>	27
	<i>Gel de poliacrilamida 6%.....</i>	27
4.2.8.	Análisis de datos.....	28
	<i>Identificación de genotipos.....</i>	28
	<i>Análisis factorial de correspondencia (AFC).....</i>	28
	<i>Relaciones interpopulacionales.....</i>	29
	<i>Diferenciación entre poblaciones (F_{st}).....</i>	30
	<i>Distancia genética.....</i>	31
	<i>Correlación entre las distancias genética y geográfica.....</i>	32
V.	RESULTADOS.....	33
5.1.	EXTRACCIÓN DE ADN.....	33
5.2.	AMPLIFICACIÓN DEL ADN (DALP) VÍA PCR.....	33
5.3.	DIVERSIDAD GENÉTICA.....	38
5.4.	ANÁLISIS FACTORIAL DE CORRESPONDENCIA (AFC)..	41
5.5.	RELACIONES INTERPOBLACIONALES.....	42
5.6.	DIFERENCIACIÓN ENTRE POBLACIONES (F_{st}).....	43
5.7.	DISTANCIA GENÉTICA.....	43
	<i>Relaciones filogeográficas entre las poblaciones.....</i>	44
5.8.	CORRELACIÓN ENTRE LAS DISTANCIAS GEOGRÁFICA Y GENÉTICA.....	45
VI.	DISCUSIONES.....	46
VII.	CONCLUSIONES.....	53
V3.	RECOMENDACIONES.....	54
IX.	RESUMEN.....	55
X.	SUMARY.....	57
XI.	REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA.....	59
	ANEXOS	

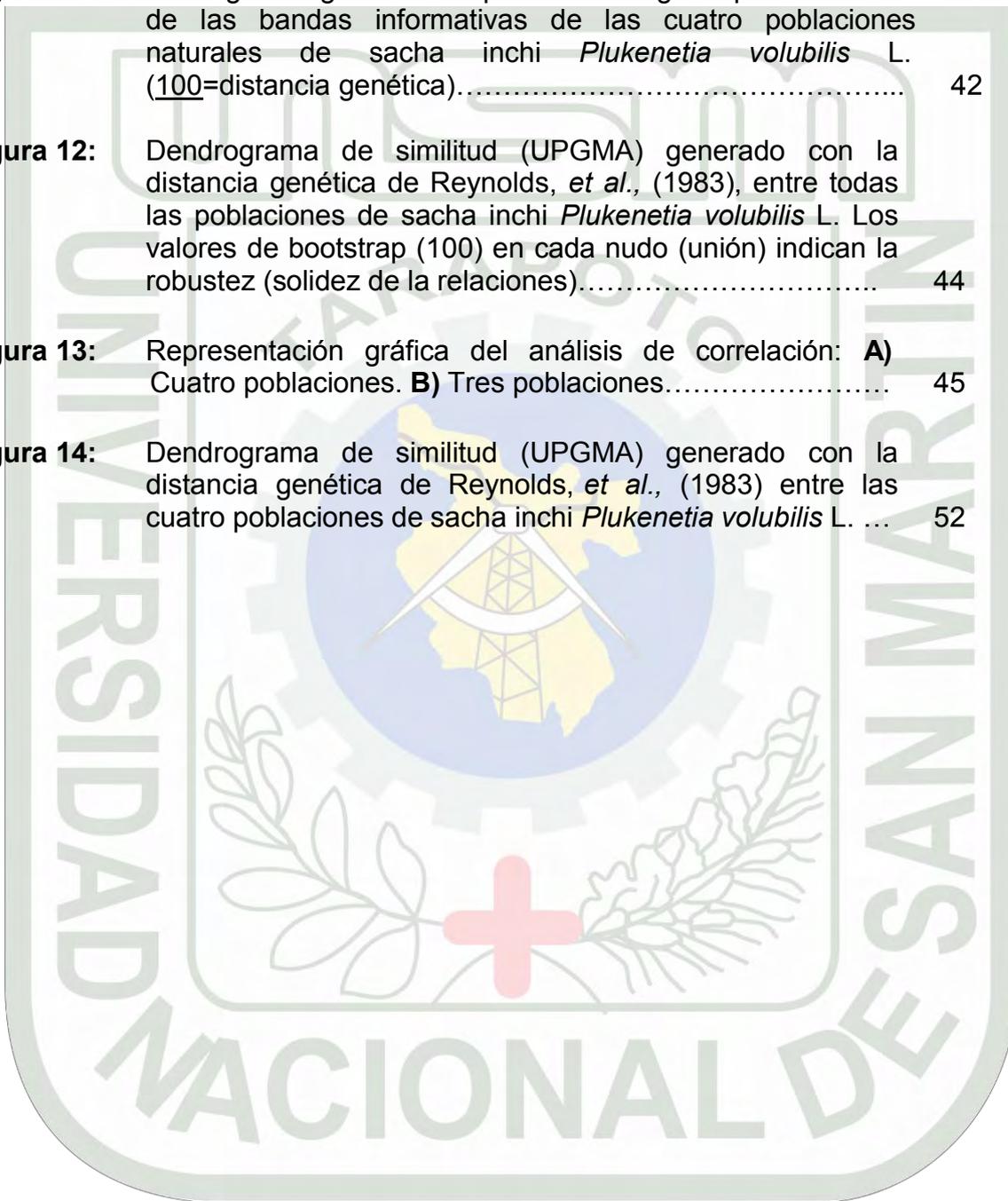
ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 01: Georeferencia de las zonas de colecta.....	23
Tabla 02: Número, referencia y secuencia de los marcadores DALP utilizados en el análisis poblacional del sachá inchi <i>Plukenetia volubilis</i> L.....	26
Tabla 03: Escala de clasificación (F_{st}) entre poblaciones	31
Tabla 04: Diversidad genética del sachá inchi <i>Plukenetia volubilis</i> L. por marcador DALP usado.....	34
Tabla 05: Genotipos encontrados en sachá inchi <i>Plukenetia volubilis</i> L. con los marcadores DALP 01, DALP 04 y DALP 08	38
Tabla 06: Matriz del estimador F_{st} para las cuatro poblaciones naturales de sachá inchi <i>Plukenetia volubilis</i> L.	43
Tabla 07: Matriz de distancia genética para las cuatro poblaciones naturales de sachá inchi <i>Plukenetia volubilis</i> L.	43
Tabla 08: Matriz de las distancias geográficas y genéticas para las cuatro poblaciones naturales de sachá inchi <i>Plukenetia volubilis</i> L. utilizada en el análisis de correlación.....	45

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 01: Distribución geográfica del sachá inchi <i>Plukenetia volubilis</i> L. en la selva alta y baja de la Amazonía peruana.....	06
Figura 02: Ubicación del sachá inchi <i>Plukenetia volubilis</i> L. en América.....	07
Figura 03: Mapa de las principales ciudades del departamento de San Martín, indicando la localización de las zonas de colecta.....	22
Figura 04: Semillas testimonio de las poblaciones naturales de sachá inchi <i>Plukenetia volubilis</i> L. donde se realizó la colecta.....	23
Figura 05: Gel de agarosa 0.8% mostrando las bandas de ADN extraído de las cuatro poblaciones naturales en estudio.....	33
Figura 06: A) Verificación de los fragmentos amplificados de ADN para las cuatro poblaciones. B) Gel de poliacrilamida 6% mostrando los fragmentos amplificados de ADN para las cuatro poblaciones. C) Representación gráfica del gel de poliacrilamida indicando las bandas informativas.....	35
Figura 07: A) Verificación de los fragmentos amplificados de ADN para las cuatro poblaciones. B) Gel de poliacrilamida 6% mostrando los fragmentos amplificados de ADN para las cuatro poblaciones. C) Representación gráfica del gel de poliacrilamida indicando las bandas informativas.....	36
Figura 08: A) Verificación de los fragmentos amplificados de ADN para las cuatro poblaciones. B) Gel de poliacrilamida 6% mostrando los fragmentos amplificados de ADN para las cuatro poblaciones. C) Representación gráfica del gel de poliacrilamida indicando las bandas informativas.....	37
Figura 09: Genotipos encontrados por cada población natural de sachá inchi <i>Plukenetia volubilis</i> L. con los marcadores DALP 01, DALP 04 y DALP 08.....	40
Figura 10: Representación gráfica de los resultados de Análisis Factorial de Correspondencia (AFC), los puntos están distribuidos sobre un plan factorial tridimensional: eje 01 (inercia 44.20%), eje 02 (inercia 18.37%) y eje 03 (inercia 12.96%) para las cuatro poblaciones naturales de sachá inchi <i>Plukenetia volubilis</i> L. en función a sus genotipos.....	41

Figura 11:	Dendrograma generado a partir de los genotipos obtenidos de las bandas informativas de las cuatro poblaciones naturales de sacha inchi <i>Plukenetia volubilis</i> L. (<u>100</u> =distancia genética).....	42
Figura 12:	Dendrograma de similitud (UPGMA) generado con la distancia genética de Reynolds, <i>et al.</i> , (1983), entre todas las poblaciones de sacha inchi <i>Plukenetia volubilis</i> L. Los valores de bootstrap (100) en cada nudo (unión) indican la robustez (solidez de la relaciones).....	44
Figura 13:	Representación gráfica del análisis de correlación: A) Cuatro poblaciones. B) Tres poblaciones.....	45
Figura 14:	Dendrograma de similitud (UPGMA) generado con la distancia genética de Reynolds, <i>et al.</i> , (1983) entre las cuatro poblaciones de sacha inchi <i>Plukenetia volubilis</i> L.	52



LISTA DE ABREVIATURAS

ADN	:	Ácido desoxirribonucleico.
DALP	:	Amplificación directa de polimorfismo de longitud.
AFC	:	Análisis factorial de correspondencia.
F_{st}	:	Diferenciación entre poblaciones.
dNTP`s	:	Desoxinucleótidos trifosfatos.
EDTA	:	Ácido etileno diamino tetraacético.
MgCl₂	:	Cloruro de magnesio.
NaCl	:	Cloruro de sodio.
PCR	:	Reacción en cadena de la polimerasa.
pH	:	Potencial de hidrogeno.
TBE	:	Tris borato EDTA.
Tris Base	:	Tris hidroximetil amino metano.
Vis/UV	:	Luz ultravioleta.
CTAB	:	Buffer de extracción.
H₂O mili-Q	:	Agua ultrapura.
Taq polimerasa	:	Enzima termoestable.

I. INTRODUCCIÓN

La Amazonía peruana, presenta una extensión de 756 866 km² y constituye la décima parte de todos los bosques del mundo (Kalliola, 1993). En el Perú, la Amazonía se divide en dos áreas geográficas naturales: selva baja y selva alta, según su ubicación altitudinal, la región de San Martín se encuentra ubicada estratégicamente entre estas dos áreas geográficas. Esta región, presenta dentro de su diversidad de recursos biológicos plantas silvestres como el “sacha inchi” *Plukenetia volubilis* L. (Valles, 1997), cuyas semillas presentan elevadas concentraciones de ácidos grasos esenciales tipo ω -3 y ω -6 (Hamaker *et al.* 1992), que le confieren un potencial económico en el mercado nutracéutico, farmacéutico y alimenticio. Actualmente, el sacha inchi viene siendo fuertemente cultivado, las semillas iniciales para la mayoría de estos cultivos provino de sus escasas poblaciones naturales, las cuales fueron sometidas a grandes presiones de colecta, muchas veces con métodos prohibitivos; esto, sumado a la creciente fragmentación de hábitats, podría estar causando una fuerte erosión genética en estas poblaciones. El estado de conservación genética de las poblaciones naturales, es esencial para establecer futuros planes de manejo y de mejoramiento genético de las especies (Rossiter *et al* 2000; Eirizik *et al.* 2001, Ferreira & Gratapaglia, 1998).

En este sentido, las técnicas moleculares son poderosas herramientas para el estudio de la diversidad genética de poblaciones naturales. Existiendo dos grupos de marcadores para estos estudios: a) aquellos basados en el conocimiento previo del

genoma y usan primers específicos (microsatelites, AFLP, secuenciamiento nucleotidico); o b) aquellos que no requieren de esta información previa y usan marcadores universales o primers arbitrarios y se acoplan a regiones homologas desconocidas del genoma produciendo padrones de bandas múltiples (DALP, ISSR, RAPD). Los marcadores DALP (amplificación directa de polimorfismo de longitud) están basadas en marcadores universales, y fueron utilizados por primera vez por Desmarais *et al.* (1998), para separar dos sub especies de ratones (*Mus musculus musculus* y *M. musculus domesticus*), reportando diferencias genéticas a nivel intraespecifico. Esta técnica también fue utilizada exitosamente para estudiar la variabilidad genética poblacional en especies vegetales medicinales como *Panax ginseng* y *Panax quinquefolius* (Ha, W. Y. *et al.* 2001); y diez poblaciones naturales de *Stephania yunnanensis* (Yun-shu *et al.* 2008), obteniéndose resultados informativos a nivel intra e interpoblacional.

El presente estudio pretende contribuir al conocimiento de la variabilidad genética en cuatro poblaciones naturales del sacha inchi *Plukenetia volubilis* L. en la región San Martín (Amazonía peruana) evaluado a través de la técnica DALP.

II. OBJETIVOS

- 2.1. Identificar los genotipos de cuatro poblaciones naturales del sachá inchi *Plukenetia volubilis* L.
- 2.2. Determinar la estructuración genética en cuatro poblaciones naturales del sachá inchi *Plukenetia volubilis* L.
- 2.3. Establecer las relaciones filogeográficas entre cuatro poblaciones naturales del sachá inchi *Plukenetia volubilis* L.



III. REVISIÓN DE LITERATURA

3.1. DEL CULTIVO DE SACHA INCHI

3.1.1. Clasificación botánica

Según Macbride (1951), el sacha inchi tiene la siguiente clasificación:

Reino	: Plantae
Sub-reino	: Fanerogama
Clase	: Dicotyledonea
Sub-clase	: Rosidae
Orden	: Euphorbiales
Familia	: Euphorbiaceae
Sub-familia	: Alcalyphoidaea
Tribu	: Plukenetieae
Sub-tribu	: Plukenetiinae
Género	: Plukenetia
Espécie	: <i>Plukenetia volubilis</i> (Linnaeus, 1753).

La especie *Plukenetia volubilis* L. es conocida de acuerdo al idioma o lugar con los siguientes nombres comunes, en el Perú: sacha maní, maní del monte, maní del inca; en Estados Unidos: inca peanut (Manco, 2006; Guillen *et al.*, 2003).

3.1.2. Descripción taxonómica de la familia Euphorbiaceae

La familia Euphorbiaceae abarca alrededor de 307 géneros y 6900 especies, se encuentra ampliamente distribuido sobre la superficie

terrestre (Gentry, 1993) y se caracteriza por agrupar árboles, arbustos, hierbas y lianas con gran valor económico en cuanto a su composición fotoquímica (alcaloides, di- o tri-terpenoides, taninos, y glucósidos cianógenos). Presentan a menudo glándulas laticíferas que contienen látex lechoso o coloreado, usualmente tóxico (Gillespie *et al.* 1997). La mayoría de las especies, presentan hojas simples alternas, con un par de glándulas en el ápice del peciolo o en la base de la hoja, sus frutos pueden ser esquizocarpos, bayas, drupas o cápsulas (Gentry, 1993; Arévalo, 1995; Judd, 1999).

3.1.3. Descripción morfológica

El sachá inchi es una planta trepadora, arbustiva, semileñosa, de altura indeterminada (Guillen *et al.* 2003). Presenta hojas alternas, de color verde oscuro, oval - elípticas, aseruladas y pinnatinervias, de 09 – 16 cm de largo y 06 – 10 cm de ancho. El ápice es puntiagudo y la base es plana o semi-arriñonada. Presenta flores hermafroditas constituidas de flores masculinas y femeninas. Las flores masculinas estaminadas dispuestas en racimos, son pequeñas y blanquecinas de forma cónica; las flores femeninas están dispuestas en la base del racimo, pudiéndose observar de una a dos flores femeninas por inflorescencia. Los frutos son cápsulas de 3.5 a 4.5 cm de diámetro, constituidos generalmente por 04 lóbulos aristados (excepcionalmente con 5 a 7); cada lóbulo contiene una semilla ovalada de diámetro entre 1.3 y 2.1 cm, es de color marrón oscuro, ligeramente abultada en el centro y aplastada hacia el borde (Gillespie y Lynn, 1993; Valles, 1995).

Cachique (2006), menciona que *Plukenetia volubilis* L. es una planta monoica, que debido a su naturaleza florística es preferentemente de polinización cruzada, presentando una asincronía entre la liberación del polen y la receptividad del estigma (Dicogamia, de la clase Protoginia).

3.1.4. Distribución en el Perú

En el Perú *Plukenetia volubilis* L. se encuentra reportada en los departamentos de San Martín, Ucayali, Huánuco, Cuzco, Amazonas, Loreto y Madre de Dios; dentro del departamento de San Martín fue reportado en la cuenca del Huallaga, en la provincia de Lamas, en el Valle de Sisa, y en Alto y bajo Mayo (Macbride, 1951; Gillespie, 1993; Valles, 1995; Manco, 2006).

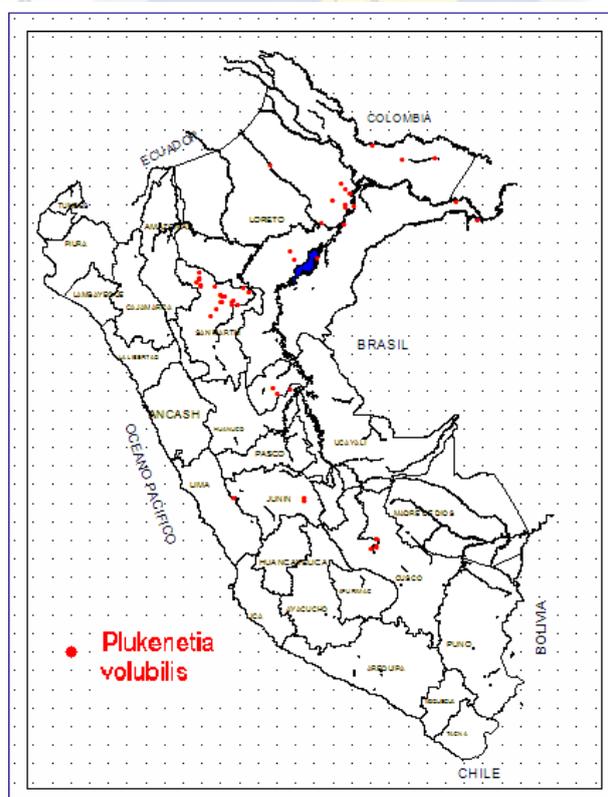


Figura 01: Distribución geográfica del sacha inchi *Plukenetia volubilis* L. en la selva alta y baja de la Amazonía peruana.

3.1.5. Distribución en América

Plukenetia volubilis L. presenta una amplia distribución geográfica, habiendo sido reportada en Brasil, Bolivia, Colombia, Costa Rica, Ecuador, Guyana Francesa, México, Panamá, Perú, Surinam y Venezuela (Correa y Bernal, 1992; Gillespie, 1993).

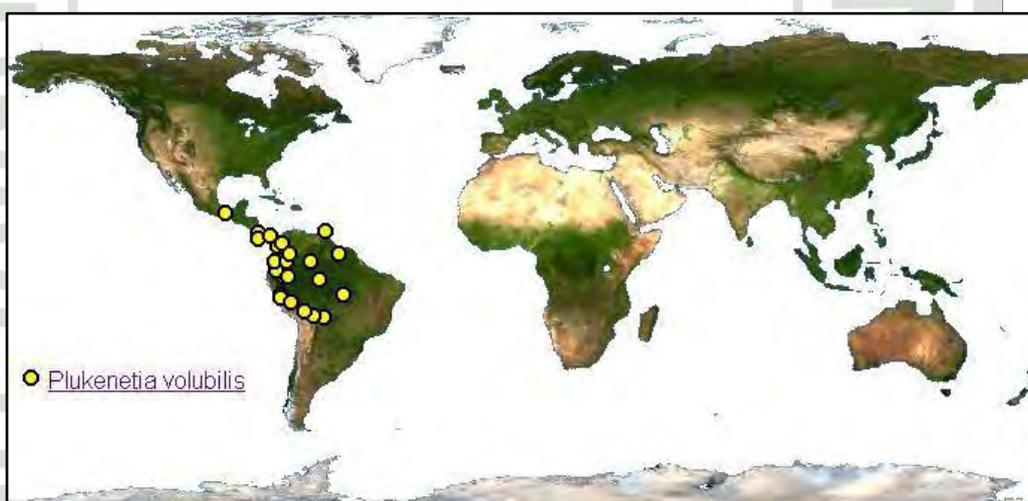


Figura 02: Ubicación del sacha inchi *Plukenetia volubilis* L. en América.

3.1.6. Ecología

Plukenetia volubilis L. es una planta nativa del trópico peruano, natural de bosques tropicales húmedos y muy húmedos, existe en estado silvestre en la selva alta y baja de la Amazonía peruana, se encuentra también en los bordes de bosques secundarios, en cañaverales, sobre cercos vivos, y también se encuentra como malezas en platanales y cultivos perennes. Tolerancia las diversas temperaturas que caracterizan a la Amazonía peruana; sin embargo, las temperaturas muy altas son desfavorables y ocasionan la caída de las flores y frutos pequeños,

principalmente los recién formados (Brack, 1999; Anaya, 2003; Manco, 2006).

3.1.7. Utilización tradicional e importancia nutricional

El sachá inchi viene siendo utilizado desde hace años por las antiguas poblaciones peruanas, esto puede ser corroborado por los restos cerámicos pre-incas encontrados en las costas del Perú (Brack, 1999; Guillen *et al.* 2003). Los nativos amazónicos también utilizaban el sachá inchi para obtener harina y aceite a partir de sus semillas; estos productos los usaban en la preparación de diferentes comidas y bebidas (Guillén *et al.* 2003). En las áreas rurales de San Martín, los pobladores utilizan desde mucho tiempo atrás la almendra de sachá inchi ya sea cocida o tostada en la preparación de diversos platos como inchicapi, ají de sachá inchi, cutacho, mantequilla de sachá inchi, inchi cucho, tamal de sachá inchi, turrón de sachá (Soukup, 1987; Brack, 1999).

La primera mención científica del Inca Inchi fue hecha 1980 a consecuencia de los análisis de contenido graso y proteico realizados en el instituto de ciencias de los alimentos de la Universidad de Cornell en USA, (D.C. Hazen & Y. Stoewsand, datos inéditos), cuyos resultados que desafortunadamente no han sido publicados establecieron que el Sachá Inchi contiene un nivel alto de aceite (54 %), proteínas (33 %) y grasas (49%) rico en ácidos grasos poliinsaturados (Omegas), comparativamente con otras semillas

oleaginosas utilizadas para el consumo humano, el aceite de la semilla del sacha Inchi tiene el más alto contenido del ácido graso linolénico Omega 3 (Hamaker *et al.* 1992).

El aceite de sacha inchi se caracteriza por tener en su composición química el más alto contenido de grasas insaturadas (91.6%) y el más bajo contenido de grasas saturadas (7.7%) con clara ventaja sobre la soya, maní y otras semillas oleaginosas. Es altamente digestible presentando antioxidantes: alfa tocoferol (vitamina E), Pro-vitamina A. Es un aceite con alto contenido de ácidos grasos esenciales (ácidos grasos esenciales son aquellos que no son sintetizados por nuestro organismo y tienen que ser incorporados mediante la ingesta de alimentos que la contentan); la carencia de estos ácidos grasos esenciales en la alimentación de los mamíferos conduce a trastornos en el crecimiento, cambios en la piel, alteraciones inmunológicas, neurológica, serios cambios conductuales y cardiopatías (Innis, 1991; Hamaker *et al.* 1992; Uauy *et al.* 1992; Anaya, 2003;). Debido a la importancia de los ácidos grasos en la salud humana; actualmente la manufactura de comidas con suplementos de Omega 3 (linolénico) tanto para la alimentación diaria, como para productos clínicos de nutrición, han crecido considerablemente (Guillén *et al.* 2003).

3.1.8. Investigaciones agronómicas en el cultivo

El sacha inchi presenta una variabilidad muy amplia, observándose cultivares y ecotipos (población vegetal natural que por haberse

desarrollado en unas condiciones naturales definidas, ostenta unas características diferenciales respecto a otras poblaciones de la misma especie) que difieren grandemente en área de follaje, tamaño y forma de sus hojas, semillas, así como en su capacidad de producción por planta y contenidos de aceite de grano; El INIA a través de la Estación Experimental El Porvenir, actualmente está recomendando los siguientes ecotipos: Pinto Recodo, Cumbaza, Tambo Yaguas y Río Putumayo, los cuales alcanzaron los más altos rendimientos de semilla en el primer año de evaluación, con tutores vivos, podas agresivas y bajo condiciones de suelo y climas no muy adecuados para el cultivo (Arévalo, 1990-1995).

A principios del año 2007 el Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana (IIAP), a través del Programa de Ecosistemas Terrestres – PET, gracias al financiamiento del proyecto INCAGRO y al Presupuesto Operativo Institucional, inició las investigaciones relacionadas al cultivo de sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.) - en el Centro de Investigaciones Pucayacu - Bello Horizonte; actualmente, mantiene y evalúan 22 accesiones de sacha inchi, 14 de poblaciones naturales y 08 del Banco Nacional de Germoplasma, observando entre ellas amplia variabilidad morfológica en la forma, tamaño, presencia de manchas y nervaduras en las semillas evaluadas, cada una con características propias de su lugar de origen, dichos materiales vienen siendo sometidos aún proceso de selección principalmente por sus características sobresalientes en cuanto a rendimiento en grano seco,

contenido de aceite y tolerancia al complejo nematodo-*fusarium* sp (Cachique, 2007-2008).

3.2. ESTRUCTURA GENÉTICA DE POBLACIONES.

Las poblaciones naturales pueden estar definidas como un grupo de individuos que comparte un mismo *pool* de genes. La estructura genética de una población natural es la consecuencia de los rasgos de vida, los cuales están determinados por los procesos asociados al nacimiento, muerte y dispersión, incluyendo el sistema de reproducción (Slatkin, 1994). Estos procesos son considerados como factores intrínsecos, sin embargo, también pueden estar influenciados por la naturaleza física de los hábitats (factores extrínsecos), como la presencia de insectos polinizadores, animales dispersores de semillas, barreras naturales, distancia geográfica, etc. Es por eso que en muchas poblaciones naturales se espera que haya una gran estructuración genética debido a las barreras de dispersión que previenen los cruces aleatorios, así como también en otras poblaciones no existe una estructura genética debido a un flujo genético continuo.

3.3. FACTORES QUE DETERMINAN LA ESTRUCTURACIÓN GENÉTICA.

3.3.1. Deriva genética

La deriva genética ocurre en poblaciones relativamente pequeñas donde algunos alelos pueden cambiar su frecuencia simplemente debido al azar. La mayoría de los organismos son diploides, es decir, tienen dos ejemplares de cada gen. Los gametos de estos organismos portan solo uno de las dos ejemplares (alelos) de cada gen. El que un

gameto lleve un alelo u otro es una cuestión de azar, por lo que la formación de gametos y su consiguiente unión para formar los cigotos de la siguiente generación solo puede describirse como un proceso probabilístico. En cada generación, esperamos una fluctuación al azar de las frecuencias alélicas en las poblaciones. Si en algún momento durante esta conducta fluctuante uno de los alelos no llega a transmitirse a la siguiente generación, entonces este alelo se habrá perdido para siempre. El resultado de la deriva suele ser la pérdida de variabilidad genética, siendo un proceso que contrarresta la entrada de variabilidad genética por mutaciones. Es necesario decir que la deriva genética tiende a formar una población homocigótica, es decir, tiende a eliminar los genotipos heterocigóticos (Galtier *et al.* 2000).

3.3.2. Selección natural

Es la fuerza creativa que lleva al proceso de adaptación de los organismos al compaginar cambios en su entorno físico y biológico. La selección natural resulta en una “Descendencia con modificación”, mientras el genotipo provee la parte heredable, la selección actúa sobre el fenotipo (forma visible), esto incluye el desarrollo, morfología y comportamiento. La idea de la selección natural como un proceso fundamental de los cambios evolutivos fue iniciada por Charles Darwin y Alfred Russel Wallace (Ayala, 1984) e implica que las poblaciones naturales estén constituidas por un pool genético con algunas variantes poco frecuentes (Futuyma, 1986). El entorno es *crucial* para la selección natural, dado que sus límites son los que determinan que

caracteres son los beneficiosos y dentro de ello, los cambios tanto en espacio como tiempo traen consigo modificaciones en los caracteres de los organismos.

3.3.3. Mutación

Ocasionalmente pueden llegar a producirse errores en la replicación del ADN, estos cambios son denominados mutaciones. Una *mutación* es un cambio estable y heredable en el material genético. Las mutaciones alteran la secuencia del ADN y por tanto introducen nuevas variantes. Muchas de éstas variantes pueden ser eliminadas, pero ocasionalmente algunas de éstas variantes pueden tener éxito e incorporarse en todos los individuos de la especie. La mutación es un factor que aumenta la diversidad genética (Hartl, 1989; Barbadilla, 2004). Una alta tasa de mutación implica un mayor potencial de adaptación en el caso de un cambio ambiental, pues permite explorar más variantes genéticas, aumentando la probabilidad de obtener la variante adecuada necesaria para adaptarse al ambiente. A su vez, una alta tasa de mutación aumenta el número de mutaciones perjudiciales o deletéreas de los individuos, haciéndolos menos adaptados, y aumentando la probabilidad de extinción de la especie.

Las mutaciones no tienen ninguna dirección respecto a la adaptación, son como un cambio al azar. Este cambio puede producir una falta de significado, y por eso la mayoría de las mutaciones son deletéreas. Pero a veces, ciertos cambios pueden introducir nuevos significados, permitiendo nuevas funciones.

3.3.4. Flujo genético

El flujo genético se define como la transferencia de material genético entre poblaciones dado por el movimiento de individuos o de sus gametos (Avice, 1994). El impacto del flujo de genes está determinado por la capacidad de dispersión de la especie, así como por barreras geográficas, distancias y estructura poblacional (Orell *et al.* 1999). El flujo génico es un componente principal de la estructura poblacional porque determina hasta que punto cada población local de una especie es una unidad evolutiva independiente. Si existe una gran cantidad de flujo génico entre poblaciones locales, entonces todas las poblaciones evolucionan juntas; pero si hay poco flujo genético cada población evoluciona en forma casi independiente (Slatkin, 1994).

3.4. USO DE ADN EN ESTUDIOS GENÉTICOS

El ácido desoxirribonucleico (ADN), es la molécula de la herencia en todos los organismos (Stryer, 1988), por ser la fuente de reserva de la información genética, ocupando una posición central en macromoléculas biológicas (Lehninger *et al.* 1995). Cada molécula de (ADN) presenta una doble hélice formada a partir de dos hebras complementarias de nucleótidos, emparejadas mediante enlaces de hidrógeno entre los pares de bases G-C y A-T (Alberts *et al.* 1996). El ADN es una combinación única de nucleótidos para cada individuo, por lo tanto sirve para poder diferenciar a los individuos, poblaciones, así como también a las especies. En la actualidad, es posible conocer el contenido genético (ADN) de cualquier especie mediante el uso de técnicas moleculares (Phillips y Mora, 1998).

3.5. MARCADORES MOLECULARES Y SU IMPORTANCIA

La identificación y selección de fenotipos es una de las actividades más antiguas del hombre y principalmente estaban basados en observaciones de las características morfológicas y/o agronómicas (Rallo *et al.* 2002). No obstante, el uso de marcadores morfológicos en las plantas tiene muchas limitantes, pues su expresión puede estar sujeta a factores ambientales o fenológicos; por ejemplo, la presencia o ausencia de espinas en los cítricos. Con frecuencia estos marcadores solo es posible evaluarlos a nivel de toda la planta y cuando ésta llega a su estado adulto, esto significa una espera, no deseable, de varios años (Powell 1992; Phillips *et al.* 1995). Con la definición de la estructura del ADN por Watson y Crick en el año 1953 se dio origen a lo que hoy conocemos como biología molecular, abriendo todo un mundo de nuevas posibilidades científicas para el conocimiento y mejor aprovechamiento de plantas, animales y microorganismos, contribuyendo en gran parte a lo que se conoce como la revolución biotecnológica (Phillips-Mora, 1998). En la actualidad diversas técnicas de biología molecular están disponibles para la detección de la variabilidad genética a nivel del ADN o sea para la detección de polimorfismo genético (diferencias genéticas), basándose fundamentalmente en el análisis de las diferencias en pequeñas secuencias del ADN entre individuos (Karp y Edwards, 1998). Estas técnicas permiten la obtención de un número virtualmente ilimitado de marcadores moleculares cubriendo todo el genoma del organismo (Ferreira y Grattapaglia, 1998).

Un marcador molecular se define como cualquier fenotipo molecular oriundo de la expresión de un gen o de segmentos específicos de ADN, que puede

ser detectado y su herencia monitoreada (Ferreira y Grattapaglia, 1998). Son importantes para la identificación y caracterización de los seres vivos, proporcionando información a los mejoradores para la selección de individuos en programas de mejoramiento genético, posibilitando el cruzamiento de materiales divergentes, teniendo como objetivo maximizar la distancia genética con la finalidad de recombinar genes reunidos en nuevas combinaciones genéticas favorables. Estos marcadores superan en la gran mayoría de los casos a las limitaciones de los métodos tradicionales, pudiendo caracterizar desde los primeros estadios de desarrollo de las plántulas, son aplicables a cualquier tipo de material vegetal y son independientes de la época del año en que se realiza el análisis y pueden ser utilizados en especies cultivadas o silvestres (Tanksley, 1983; Powell, 1992; Phillips *et al.* 1995; Rallo *et al.* 2002; Azofeifa-delgado, 2006). Son considerados además como la manera más directa de medir y cuantificar la variación genética dentro y entre las especies (Navajas y Fenton, 2000).

3.6. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Existe una gran diversidad de primers para trabajos con técnicas moleculares basados en la reacción en cadena de la polimerasa – PCR (Mullis *et al.* 1986). La facilidad, rapidez, versatilidad y sensibilidad de esta técnica lo convierte en una herramienta particularmente poderosa para estudios genéticos moleculares envolviendo a gran número de individuos de cualquier organismo vivo, por lo cual son cada vez más utilizados (Ferreira y Grattapaglia, 1998). El PCR permite la amplificación *in Vitro* de fragmentos específicos de ADN a partir de cantidades mínimas del ADN patrón, aun

cuando ese ADN sea de calidad relativamente baja (Erlich, 1989). La técnica de PCR consta de tres etapas: La primera etapa es la denaturación el cual sucede generalmente a una temperatura que varía entre 90°C a 95°C y tiene por finalidad obtener moléculas de ADN de una sola hebra; en la segunda etapa conocida como hibridación que se da generalmente entre 40°C a 60°, los primers (oligonucleótidos de 10 a 30 nucleótidos) se unen a sus secuencias complementarias; y en la tercera etapa llamada de extensión ó amplificación la temperatura varía entre 70°C a 75°C, donde la enzima Taq polimerasa añade sucesivamente nucleótidos en dirección 5' a 3' hidroxilo del primer, teniendo como molde a la hebra de ADN complementaria que es antiparalela. Después de "n" ciclos, una sola copia inicial de la plantilla de ADN teóricamente puede ser amplificado a 1 billón de copias (Innis *et al.* 1990; Tenover *et al.* 1997; Saunders *et al.* 2003).

En la actualidad se registra un aumento en las técnicas de marcadores moleculares basados en PCR utilizando marcadores universales o específicos, entre los que podemos mencionar: Amplificación Aleatoria de Polimorfismo de ADN (RAPD), Polimorfismo en la Longitud de los Fragmentos Amplificados (AFLP), microsatélites (SSR), Inter Secuencias simples repetidas (ISSR), amplificación directa de polimorfismo de longitud (DALP), etc. (Desmarais *et al.* 1998; Azofeifa-delgado, 2006).

3.7. AMPLIFICACIÓN DIRECTA DE POLIMORFISMO DE LONGITUD (DALP)

Para las especies del género *Plukenetia*, no existen marcadores genéticos específicos que puedan ser utilizados en estudios a nivel molecular. En este

sentido, el uso de marcadores universales como la técnica DALP “Amplificación Directa de Polimorfismo de Longitud” son de gran utilidad en el establecimiento de diferencias genéticas en muchas especies diferentes, especialmente en aquellas donde la base de datos del ADN es desconocida (Dávila, 2007), como es el caso del sachu inchi. Esta técnica, se basa en el uso de primers arbitrarios (AP-PCR), compuesto de un primer reverso (fijo) que puede ser utilizado en combinación con cualquiera de los ocho Primers selectivos. Es decir, en cada experimento se requiere de dos primers y entre dos experimentos solo un primer es cambiado (primer selectivo). Esta técnica fue diseñada para que cada par de primers; pueda producir un patrón específico de bandas múltiples; es decir, cada par de primer amplifica una determinada región específica del genoma (Desmarais *et al.* 1998; Hoarau y Borsa, 2000).

Esta técnica permite la detección de micro-delecciones/inserciones y regiones microsatélite en el ADN, es útil en el estudio genético de poblaciones, en el mapeamiento genómico (para definir secuencias adyacentes en sitios polimórficos), en el estudio directo de la transmisión de alelos, así como en el mapeo temprano de los marcadores o selección de *loci* asociados con algunos rasgos o enfermedades. Una de sus principales ventajas, es que no requiere de la construcción previa de una biblioteca de ADN, por lo que es un proceso más corto y económico. Es decir, la técnica DALP es totalmente independiente de cualquiera conocimiento *a priori* de la región a flanquear (estudiar), por lo que es utilizado en forma exitosa en el estudio genéticos de diferentes organismos desde plantas hasta animales, como en ratones (*Mus*

musculus musculus y *M. musculus domesticus*), peces (*Oreochromis niloticus* y *Sarotherodon melanotheron*), aves (*Larus cachinnans* y *L. audouinii*), acaro (*Amblyseius californicus*) y muchas especies vegetales de importancia medicinal como *Panax ginseng*, *Panax quinquefolius* y *Stephania yunnanensis* entre otras, generando en todos estos estudios información sobre la estructura genética, estado de conservación , flujo genético, grado de diferenciación genético, entre otros (Desmarais *et al.* 1998; Hoarau & Borsa, 2000; Ha, W. Y. *et al.* 2001; Wang *et al.* 2001; Yun – shu *et al.* 2007).



IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. MATERIALES

4.1.1. Materiales de vidrio:

- Matraces.
- Probetas.

4.1.2. Materiales de plástico:

- Guantes quirúrgicos.
- Gradillas para microtubos.
- Micropipetas de 2.5, 10, 20, 100, 200 y 1000 μ l.
- Microtubos de 0.2, 0.5, 1.5 y 2 ml.
- Tips de 10, 100, 200 y 1000 μ l.
- Sistemas de electroforesis vertical y horizontal.

4.1.3. Material biológico:

- Brotes de hojas tiernas (Primordios foliares)

4.1.4. Reactivos:

- CTAB (Hexadecyltrimethylammonium bromide).
- Ácido bórico.
- EDTA (Etylenodiaminetetraacetic acid).
- Cloruro de sodio (NaCl).
- Trizma Base (Tris [hydroxymethyl] aminomethane).
- Etanol absoluto.
- Hidróxido de sodio.
- Cloroformo.
- Isopropanol.
- Proteinasa K.
- Kit para PCR (Cloruro de Magnesio; Taq ADN Polimerasa, *Thermus aquaticus*; Buffer).
- Kit de desoxyribonucleosido trifosfatos (dNTPS).

- Primers DALP (cebadores).
- Agarosa.
- Bromuro de etidio.
- Azul bromofenol.
- Persulfato de amonio.
- Temed.
- Poliacrilamida.
- Ácido nítrico.
- Nitrato de plata.
- Carbonato de sodio.
- Formaldehído.

4.1.5. Equipos:

- Autoclave digital (Yamato – SE 310).
- Balanza analítica 220g (SARTORIUS).
- Baño María (JSB).
- Cámara de electroforesis horizontal pequeña. MINI – SUB (Bio – Rad).
- Cámara de electroforesis vertical (fisher Biotech).
- Centrifuga refrigerada (Eppendorf – 5804R).
- Espectrofotómetro (Modelo Genesys 10uv).
- Fotodocumentador de geles (GEL LOGIC 100. Imageng sisten kodak).
- Horno microondas (LG).
- Mini vortexer (Fisher Scientific).
- Destilador de agua (BARNSTEAD).
- Sistema de purificación de agua (Milli Pore).
- Termociclador (Eppendorf – Master Cycler).

4.2. METODOLOGÍA

4.2.1. Área de estudio

La colecta de las muestras se realizó en el departamento de San Martín (Figura 03), en cuatro poblaciones naturales de sachá inchi *Plukenetia volubilis* L. ubicado en las localidades de Habana, Shica, Cerro Alto y Tununtunumba (Tabla 01).

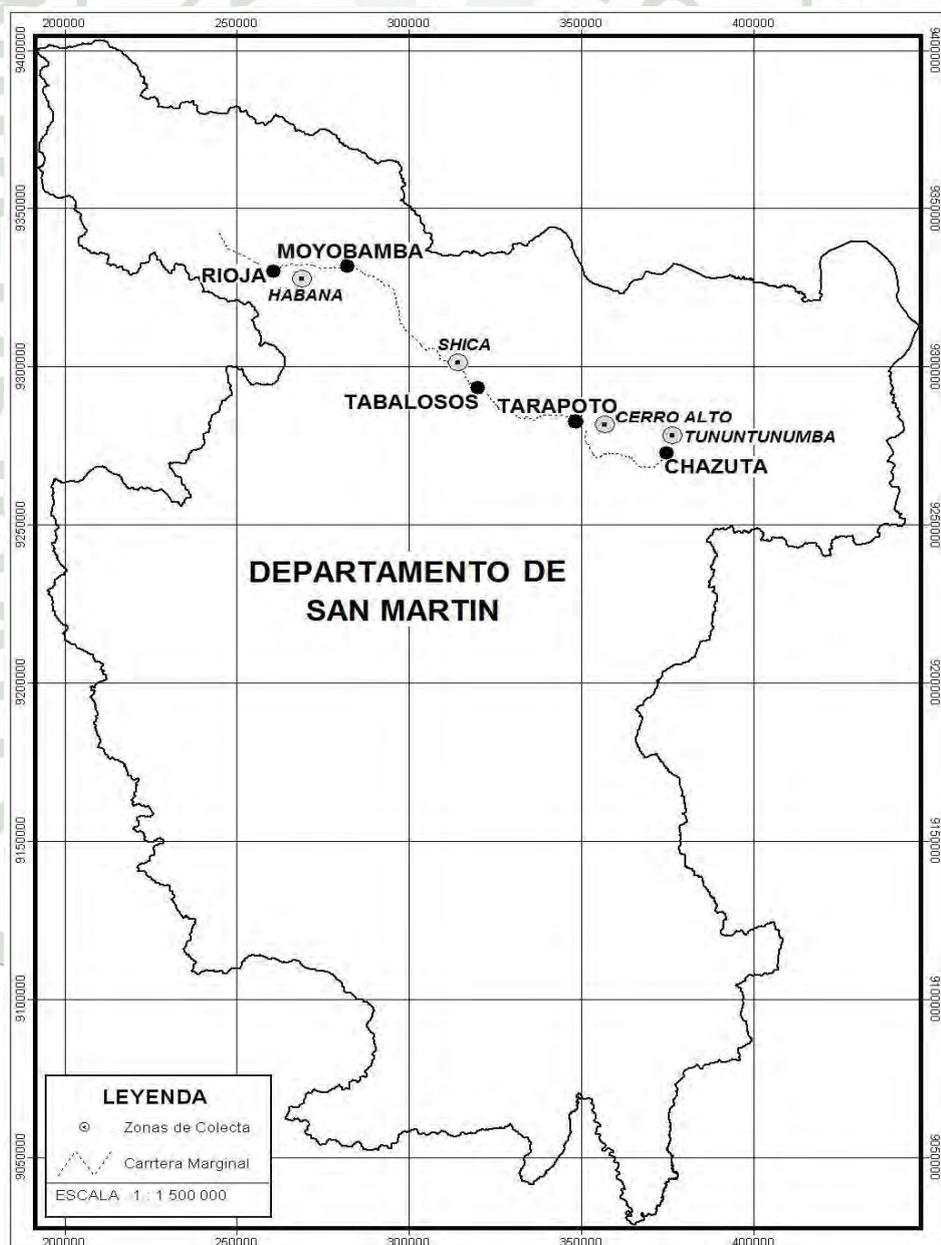


Figura 03: Mapa de las principales ciudades del departamento de San Martín indicando la localización de las zonas de colecta.



Figura 04: Semillas testimonio de las cuatro poblaciones naturales de sacha inchi *Plukenetia volubilis* L. evaluadas.

Tabla 01: Georeferencia de las zonas de colecta.

Departamento	Poblaciones	Distrito	Latitud	Longitud	Plantas
	Tununtunumba	Chazuta	UTM 9275914	18M 0377811	21
	Cerro Alto	Bda. Shilcayo	UTM 9281954	18M 0357544	21
	Shica	Tabalosos	UTM 9301077	18M 0315372	20
	Habana	Habana	UTM 9326684	18M 0268917	21

4.2.2. Colecta, codificación y conservación del material biológico

Se colectó mediante muestreo aleatorio simple, muestras biológicas (hojas tiernas) de 21 plantas por población (excepto en la población de Shica = 20 muestras). El material colectado, se acondicionó en papel aluminio perfectamente codificado y fue conservado dentro de tubos falcón de 50ml con tapa rosca conteniendo un preservante sintético (sulfato de calcio anhidro) hasta su utilización en el laboratorio (Anexo 01).

4.2.3. ea de trabajo

El presente trabajo se ejecuto en el Laboratorio de Biología y Genética Molecular (LBGM) del Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana (IIAP), ubicada en el centro de investigaciones de Quistococha, carretera Iquitos-Nauta km 4.5, distrito de San Juan Bautista, región Loreto – Perú.

4.2.4. Extracción de ADN

La extracción de ADN (Anexo 02) se realizó a partir de 100mg de hoja tierna y mediante el protocolo CTAB propuesto por Doyle & Doyle (1987), que se detalla a continuación:

- a) Triturar la muestra (100mg) en buffer CTAB (CTAB 2%, NaCl 1.5M, EDTA 25mM, Tris HCl 0.1M pH = 8, 2 Mercaptoetanol 0.2%) y Proteinasa K (10mg/ml).
- b) Macerar la muestra en baño maría a 60° x 24 horas.
- c) Separar el material genómico con cloroformo mediante un centrifugado a 8000 rpm x 5 minutos.
- d) Precipitar el material genómico con isopropanol helado a -20°C x 2 horas mediante un centrifugado a 13000 rpm x 15 minutos.
- e) Lavar el pellet (ADN) con etanol helado al 70% (dos veces).
- f) Secar del pellet (ADN) a temperatura ambiente durante aproximadamente 5 horas. Finalmente resuspender el pellet en 30 µl de agua ultrapura.

4.2.5. Verificación del ADN extraído

Espectrofotometría

Se evaluó la pureza y concentración aproximada de ADN extraído mediante el método espectrofotométrico de Maniatis (1989), utilizando un espectrofotómetro UV/Visible (Anexo 03). La pureza y concentración de la muestra se determinó en base a la capacidad de absorvancia de la misma, utilizando las longitudes de ondas de 260 y 280 nm. La evaluación de la calidad en pureza de la extracción, se determinó en un rango aceptación entre: 1.7 – 2.2 (A_{260}/A_{280}) y la concentración del ADN extraído se calculó multiplicando: $[A_{260} \times FD \times 50 \mu\text{g}/\mu\text{l}]$.

Electroforesis

La verificación de la calidad de la extracción, se realizó mediante la observación de bandas de ADN en geles de agarosa 0.8% teñido con bromuro de etidio (10 mg/ml) a razón de 1 $\mu\text{l}/50\text{ml}$. Para lo cual se realizó la migración en una cámara electroforética horizontal a 100 [V] por espacio de 30 minutos. Los resultados obtenidos fueron visualizados en un transluminador de rayos UV y finalmente los geles fueron fotodocumentados en un sistema de imagen GEL LOGIE 100, KODAK con la finalidad de tener un registro de las corridas electroforéticas .

4.2.6. Amplificación de ADN (DALP) vía PCR

Para éste estudio se utilizaron los ocho marcadores de la técnica DALP, formados a partir de las combinaciones del primer reverso (fijo) con cada uno de los primers selectivos. La técnica DALP, se basa en la amplificación de fragmentos arbitrarios de ADN, donde cada marcador (par de primers) se hibrida con cualquier región del genoma donde encuentre homología, produciendo un patrón específico de bandas múltiples, es decir, cada marcador amplifica una determinada región del genoma. Los primers (Tabla 02) utilizados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) fueron:

Tabla 02: Número, referencia y secuencia de los marcadores DALP utilizados en el análisis poblacional del sacha inchi *Plukenetia volubilis* L.

Tipo de primer	Primers	Fuente	Secuencia
Primer reverso	DALP R	Desmarais <i>et al.</i> 1998	TTTCACACAGGAAACAGCTATGAC
Primers selectivos	DALP 01	Desmarais <i>et al.</i> 1998	GTTTTCCCAGTCACGACGC
	DALP 02	Desmarais <i>et al.</i> 1998	GTTTTCCCAGTCACGACAGC
	DALP 03	Desmarais <i>et al.</i> 1998	GTTTTCCCAGTCACGACGAC
	DALP 04	Desmarais <i>et al.</i> 1998	GTTTTCCCAGTCACGACACG
	DALP 05	Desmarais <i>et al.</i> 1998	GTTTTCCCAGTCACGACCAG
	DALP 06	Desmarais <i>et al.</i> 1998	GTTTTCCCAGTCACGACCAC
	DALP 07	Desmarais <i>et al.</i> 1998	GTTTTCCCAGTCACGACTCAG
	DALP 08	Desmarais <i>et al.</i> 1998	GTTTTCCCAGTCACGACCTAG

Las reacciones de amplificación (PCR) se prepararon en volúmenes finales de 25µl, conteniendo 6.5µl ADN molde (100ng/µl), 0.39µl de Taq polimerasa (5U/µl), 5µl Buffer (5X), 0.75µl dNTP's (10mM), 5.63µl MgCl₂ (25mM), 2.0µl de cada primer (10µM) y 2.73µl de agua ultrapura (Anexo 04). La amplificación fue realizada en un termociclador

Eppendorf (Anexo 05), con las siguientes condiciones de temperatura: una denaturación inicial a 95°C x 1min., seguida de 29 ciclos consistente de: **a)** Denaturación a 91°C x 30 seg.; **b)** Hibridación a 42.9°C x 30 seg.; y **c)** Extensión a 72°C x 30 seg. Seguida de una extensión final a 72°C x 5 min. (Anexo 06).

4.2.7. Electroforesis de los productos de amplificación

Gel de agarosa 2 %

Para verificar el éxito del PCR, los productos amplificados fueron migrados inicialmente en cámaras electroforéticas horizontales usando geles de agarosa al 2 % teñidos bromuro de etidio (10 mg/ml) a razón de 1 µl/50m. La migración de los productos amplificados se realizó a 100 [V] durante 1 hora y se visualizó en un transluminador de luz UV (Anexo 07).

Gel de poliacrilamida 6 %

Finalmente, el polimorfismo entre las muestras fue verificado en geles de poliacrilamida (Anexo 08), mediante un análisis en base a la presencia (A) o ausencia (B) de las bandas. Para lo cual, se realizó corridas electroforéticas 300 [V], 100 [mA], 100 [W] por espacio de 2 a 3 horas en geles de poliacrilamida 6 % (Anexo 09), los cuales fueron revelados mediante la tinción argéntica utilizando el método de tinción Rabat - Nitrato de Plata (Anexo 10).

4.2.8. Análisis de datos

Con la finalidad de establecer las diferencias genéticas a nivel intra e Interpoblacionales en sachá inchi *Plukenetia volubilis* L. se realizaron los siguientes análisis:

- a) Diversidad genética
- b) Análisis factorial de correspondencia (AFC)
- c) Relaciones interpoblacionales
- d) Diferenciación entre poblaciones (F_{st})
- e) Distancia genética (D)
- f) Correlación entre las distancias geográfica y genética

Identificación de genotipos

Para la identificación de genotipos se seleccionaron a los marcadores polimórficos, es decir los marcadores que revelaron un polimorfismo claro y consistente con buena nitidez y repetitividad. De cada marcador polimórfico, se identificó a las bandas informativas, las cuales fueron codificadas en base a la presencia (A) o ausencia (B). Con cada marcador polimórfico, se generó un perfil genético para cada planta, los genotipos para cada planta se formaron sumando los perfiles genéticos obtenidos con cada uno de los marcadores polimórficos.

Análisis factorial de correspondencia (AFC)

Es un análisis multivariado, que describe el comportamiento o las tendencias de un conjunto de individuos identificados como una serie de variables o descriptores. El objetivo principal es generar una

representación gráfica de los individuos en un espacio de dos o tres dimensiones en función de sus proximidades (Gazel, 1999). Este análisis, pone en evidencia diferentes grupos correspondientes a las combinaciones lineales de las variables, independientemente de su pertenencia a grupos definidos, poblaciones o procedencia geográfica.

Para el presente análisis, se realizó una matriz binaria en base a la presencia (1) y ausencia (0) de las bandas para el tratamiento de los datos en el Software GENETIX versión 4.05 (Belkhir *et al.* 2004). En esta investigación, se realizó el análisis factorial de correspondencia (AFC) para determinar la estructuración genética en cada una de las cuatro poblaciones naturales de sachá inchi.

Relaciones interpopulacionales

Se utilizó el Método de Parsimonia de Wagner (Eck & Dayhoff, 1966), que permitió visualizar las relaciones existentes entre los 83 individuos pertenecientes a las cuatro poblaciones. El criterio del método fue el de encontrar el árbol (dendrograma) que requiere el número mínimo de cambios, el cálculo se realizó con los programas Seqboot, Mix y Consense del paquete de inferencia filogenética PHYLIP versión 3.5 (Felsenstein, 1993) y visualizado en el software TREVIEW (Page, 1996).

Diferenciación entre poblaciones (F_{st})

Llamado también índice de fijación, sirve para determinar las diferencias genéticas entre diferentes poblaciones tomadas de dos en dos. El F_{st} fue estimado sobre todas las poblaciones y entre cada par de poblaciones. La fórmula utilizada para calcular el F_{st} fue propuesta por Weir & Cockerham, (1984) y Weir, (1990).

$$F_{st} = \frac{\sum(A_i)}{\sum(A_i + B_i + C_i)}$$

Donde:

A_i = Componente de los perfiles entre los grupos.

B_i = Componente de la variación de los perfiles dentro de cada grupo.

$C_i = 0$

Los valores del F_{st} varían entre 0 y 1, cuando $F_{st} = 0$, las diferentes sub-poblaciones se comportan como una sola población indicando que no existe divergencia genética entre ellas, cuando el $F_{st} = 1$, la estructuración es máxima lo que sugiere que las sub-poblaciones presentan diferentes alelos (variables) fijados. Se establece la siguiente escala para clasificar el grado de diferenciación genética existente entre poblaciones (Tabla 03):

Tabla 03: Escala de clasificación (F_{st}) entre poblaciones

Valores de F_{ST} (Tomado de Hartl & Clark, 1997)

0.00 – 0.05	Diferenciación genética pequeña
0.05 – 0.15	Diferenciación genética moderada
0.15 – 0.25	Diferenciación genética alta
$F_{st} > 0.25$	Diferenciación genética muy alta

Para la significancia (P) de los valores F_{st} obtenidos, son calculados al compara el estimador del F_{st} real con 1000 estimadores de F_{st} obtenidos en situaciones donde no hay estructuración, rompiendo la hipotética estructuración real de manera artificial por permutaciones de los individuos en el conjunto de las poblaciones. Se considera que la diferencia es significativa cuando el F_{st} real es mayor a 95 % ($P < 0.05$) en relación a los F_{st} de las 1000 situaciones sin estructuración.

Para el presente análisis, se realizó una matriz binaria en base a la presencia (1) y ausencia (0) de las bandas, para el tratamiento de datos en el Software GENETIX versión 4.05 (Belkhir *et al.* 2004).

Distancia genética

Sirve como una medida de las diferencias genéticas entre poblaciones tomadas de dos en dos. Esta medida fue estimada en base a la distancia genética calculadas con la fórmula de Reynolds *et al.* (1983), mediante el software GENETIX versión 4.05 (Belkhir *et al.* 2004).

$$D = - \text{LN} (1 - F_{st})$$

Donde:

D = Distancia genética.

LN= Logaritmo Neperiano

F_{st} = Medida de la estructuración entre las poblaciones analizadas.

A partir de la distancia genética de Reynolds *et al.*, (1983), se agrupó a las poblaciones según el criterio de asociación del método UPGMA (Unweighted Pair Group Method with the Arithmetic Averaging) utilizando el programa NEIGHBOR del software PHYLIP versión 3.5 (Felsenstein, 1993), para generar un dendrograma que se visualizó en el software TREEVIEW (Page, 1996). Cada población fue tratada como una unidad taxonómica operacional y el soporte estadístico para los nudos fue obtenido de 1000 muestras de bootstrap. Los valores en los nudos indican el porcentaje de ocurrencia que los demás cluster (Poblaciones) unidos a este nudo presentan la estructuración mostrada.

Correlación entre las distancias geográfica y genética

Las relaciones entre las distancias genética (Reynolds *et al.* 1983) y geográfica (Km), fueron determinadas a partir de coeficiente de regresión de PEARSON, calculado en el software Microsoft Excel 2007.

V. RESULTADOS

5.1. EXTRACCIÓN DE ADN

Se logró extraer satisfactoriamente el ADN (Figura 05) de 83 plantas, pertenecientes a cuatro poblaciones naturales: Tununtunumba (21), Shica (20), Habana (21), Cerro Alto (21).

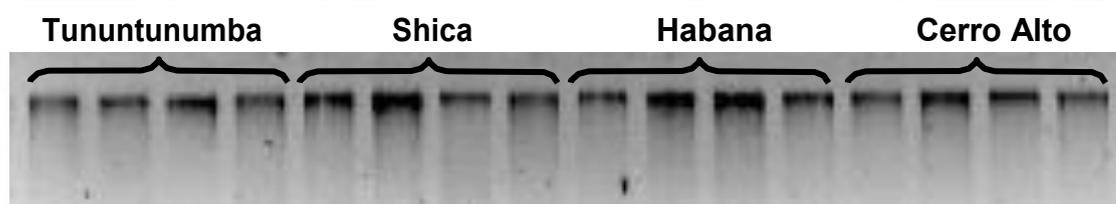


Figura 05: Gel de agarosa 0.8% mostrando las bandas de ADN extraído de las cuatro poblaciones naturales en estudio.

5.2. AMPLIFICACIÓN DEL ADN (DALP) VÍA PCR

De los ocho marcadores utilizados en la amplificación de ADN con la técnica DALP, tres resultaron polimórficos (DALP221, DALP233 y DAL242) mostrando diferenciación a nivel intra e interpoblacional. Estos tres marcadores, generaron un total de 65 bandas de ADN haciendo un promedio de 21.67 bandas por marcador usado. De las 65 bandas, 21 fueron informativas representando el 32.31%. El número promedio de bandas informativas amplificadas por cada marcador fue siete, representando el 10.77% (Tabla 04).

El marcador DALP 221 fue el más polimórfico, presentando nueve bandas informativas (diferenciales) entre las poblaciones; dos de las cuales fueron diagnosticas (exclusivas) para la población de Tununtunumba: a) la banda 05

que estuvo ausente en esta población y presente en todos los individuos de las otras poblaciones, b) la banda 06 presente únicamente en esta, no observándose en ninguno de los individuos de las otras tres poblaciones restantes (Figura 06).

Así mismo, el marcador DALP 233 mostró siete bandas informativas compartidas entre las diferentes poblaciones, pero ninguna banda diagnóstica que pudiera caracterizar a una población en particular de las cuatro poblaciones de sachá inchi estudiadas (Figura 07).

Finalmente con el marcador DALP 242 se observó cinco bandas informativas. De las cuales, la banda 03 fue diagnóstica (exclusiva) para la población de Shica; estando presente en todos los individuos de esta población y ausente en las otras poblaciones (Figura 08).

Tabla 04: Diversidad genética del sachá inchi *Plukenetia volubilis* por marcador DALP usado.

Marcadores Polimórficos	Total de Bandas Amplificadas	Bandas Informativas	PBI (%)	Bandas Diagnósticas
DALP 221	21	9	13.85	2
DALP 233	21	7	10.77	--
DALP 242	23	5	7.69	1
Total	65	21	32.31	3
Promedio	21.67	7	10.77	1

PBI: Porcentaje de bandas informativas.

MARCADOR DALP 221

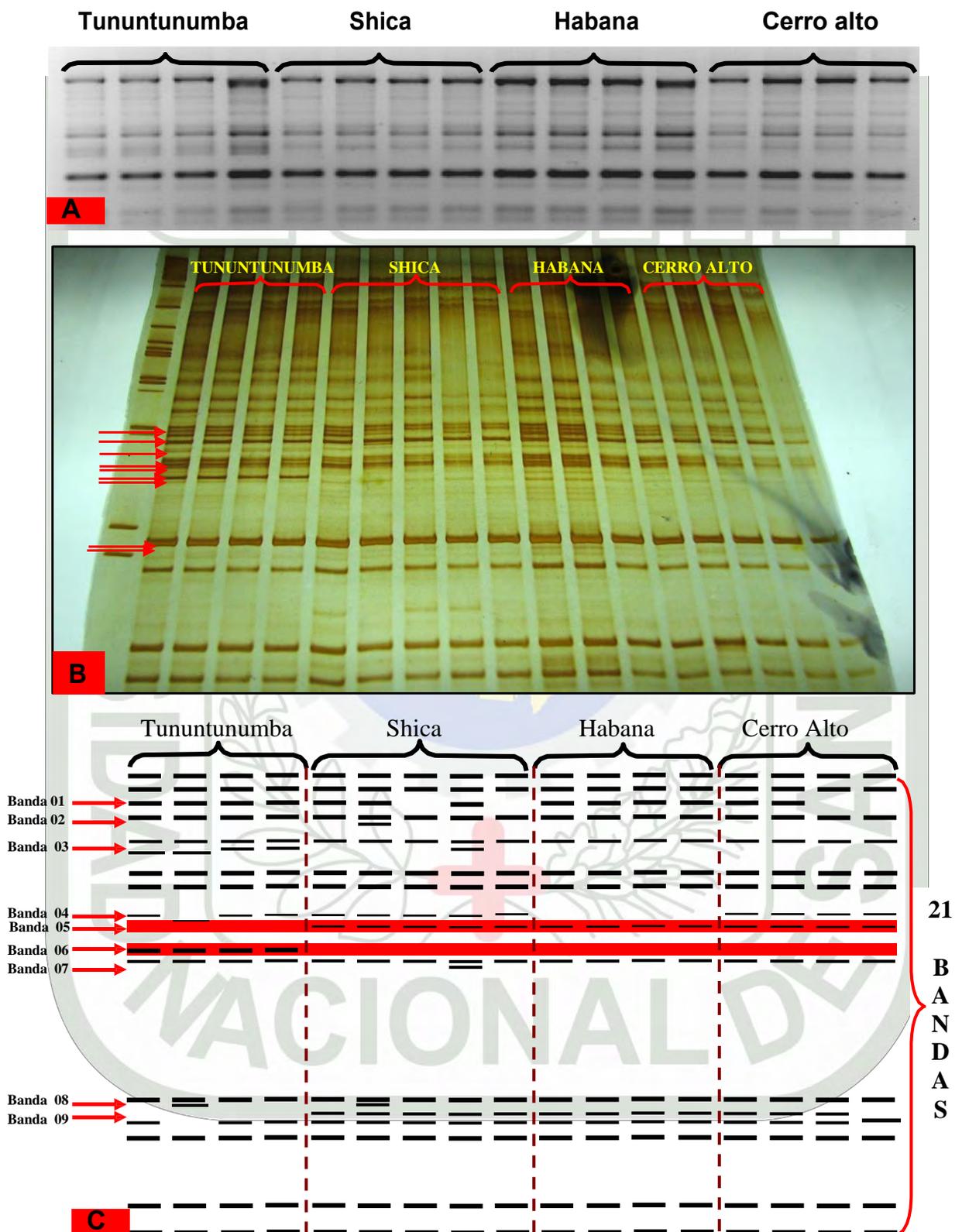


Figura 06: **A)** Verificación de los fragmentos amplificados de ADN para las cuatro poblaciones. **B)** Gel de poliacrilamida 6% mostrando los fragmentos amplificados de ADN para las cuatro poblaciones. **C)** Representación gráfica del gel de poliacrilamida indicando las bandas informativas.

MARCADOR DALP 233

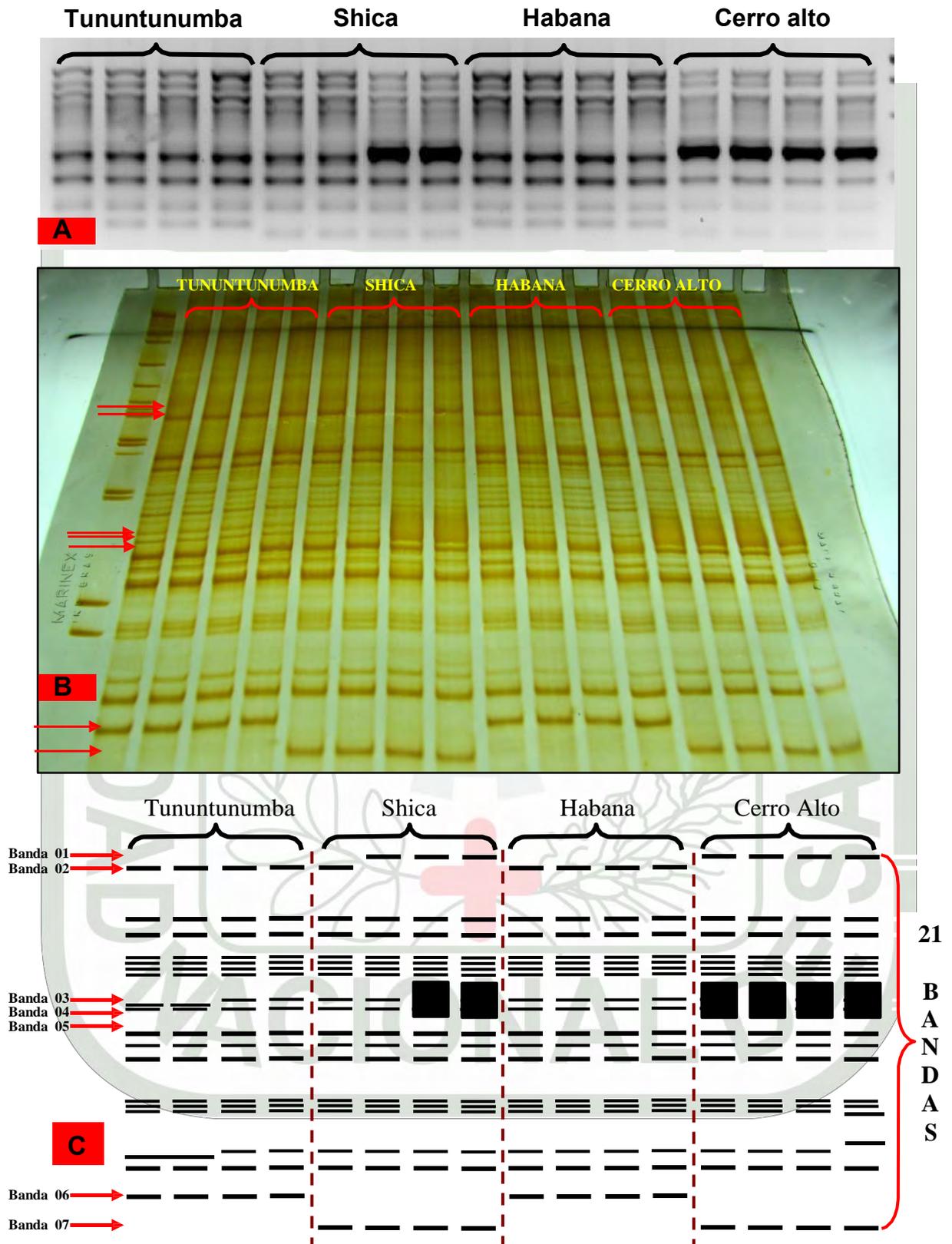


Figura 07: **A)** Verificación de los fragmentos amplificados de ADN para las cuatro poblaciones. **B)** Gel de poliacrilamida 6% mostrando los fragmentos amplificados de ADN para las cuatro poblaciones. **C)** Representación gráfica del gel de poliacrilamida indicando las bandas informativas.

MARCADOR DALP 242

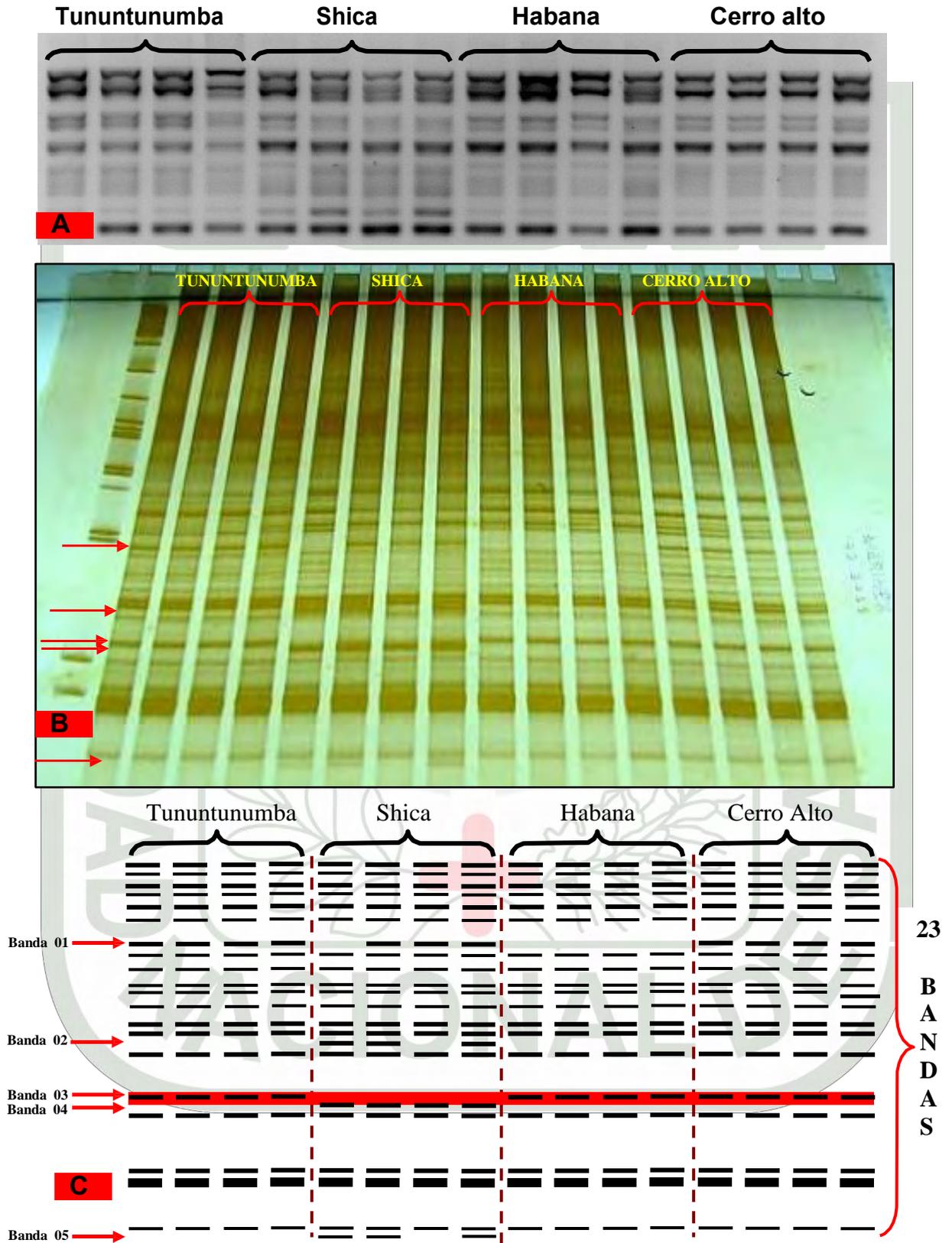


Figura 08: **A)** Verificación de los fragmentos amplificados de ADN para las cuatro poblaciones. **B)** Gel de poliacrilamida 6% mostrando los fragmentos amplificados de ADN para las cuatro poblaciones. **C)** Representación gráfica del gel de poliacrilamida indicando las bandas informativas.

5.3. DIVERSIDAD GENÉTICA

Los genotipos para cada población natural de *Plukenetia volubilis* L. fueron determinados a partir de la suma de los perfiles genéticos obtenidos con los marcadores polimórficos DALP 221, DALP 233 y DALP 242 (Tabla 05).

Tabla 05: Genotipos encontrados en sacha inchi *Plukenetia volubilis* L. con los marcadores DALP 221, DALP 233 y DALP 242.

Poblaciones	Nº de Individuos	DALP 221	DALP 233	DALP 242	GENOTIPO
Tununtunumba (2)	20	ABAABABBB	BAAABAB	ABABB	A B A A B A B B B B A A A B A B A B A B B
	1	ABAABABBB	ABAABAB	ABABB	A B A A B A B B B A B A A B A B A B A B B
Shica (15)	1	ABAAABBBB	ABAABBA	BABAA	A B A A A B B B A A B A A B B A B A B A A
	1	ABAAABBBB	ABAABBA	AABAA	A B A A A B B B A A B A A B B A A A B A A
	1	ABAAABBBB	ABBBABA	ABBAB	A B A A A B B B A A B B B A B A A B B A B
	3	BBBAABBBB	ABBBABA	AABAA	B B B A A B B B B A B B B A B A A A B A A
	1	BBBAABBBB	ABBBABA	ABBAB	B B B A A B B B A A B B B A B A A B B A B
	2	ABBAABBBB	ABBBABA	AABAA	A B B A A B B B B A B B B A B A A A B A A
	1	BBBBABBBB	ABBBABA	ABBAB	B B B B A B B B A A B B B A B A A B B A B
	1	ABBAABBBB	BAAABBA	ABBBA	A B B A A B B B B B A A A B B A A B B B A
	3	ABBAABBBB	ABBBABA	AABAA	A B B A A B B B A A B B B A B A A A B A A
	1	ABBAABBBB	ABBBABA	ABBAA	A B B A A B B B B A B B B A B A A B B A A
	1	ABBAABAAA	ABBBABA	ABBAA	A B B A A B A A A A B B B A B A A B B A A
	1	AABAABBBB	ABBBABA	AABAA	A A B A A B B B A A B B B A B A A A B A A
	1	BBBAABBBB	BAAABBA	AABAB	B B B A A B B B A B A A A B B A A A B A B
	1	ABBAABBBB	BABBABA	AABAB	A B B A A B B B A B A B B A B A A A B A B
1	ABBAABBBB	BABBAAA	BABAB	A B B A A B B B A B A B B A A A B A B A B	

Continuación de la tabla 05

Poblaciones	N° de Individuos	DALP 221	DALP 233	DALP 242	GENOTIPO
Habana (3)	18	ABBBABBBA	BAAABAB	BBABB	A B B B A B B B A B A A A B A B B B A B B
	2	ABBBABBBA	ABAABAB	BBABB	A B B B A B B B A A B A A B A B B B A B B
	1	ABBBABABA	BAAABAB	BBABB	A B B B A B A B A B A A A B A B B B A B B
Cerro Alto (4)	16	BBBAABBBA	ABBBABA	ABABB	B B B A A B B B A A B B B A B A A B A B B
	1	BBAAABBBA	ABBBABA	ABABB	B B A A A B B B A A B B B A B A A B A B B
	1	ABAAABBBA	ABBBABA	ABAAA	A B A A A B B B A A B B B A B A A B A A A
	3	ABBAABBBA	ABBBAAA	ABABB	A B B A A B B B A A B B B A A A A B A B B

En total fueron encontrados 24 genotipos diferentes, distribuidos entre las cuatro poblaciones evaluadas, no encontrándose ningún genotipo compartido entre las poblaciones. La población de Shica, fue la que presentó una mayor diversidad intrapoblacional (15 genotipos), siendo los genotipos más frecuentes: BBBAABBBBABBABAAABAA y ABBAABBBAABBBABAAABAA igual a tres individuos (15%) cada una. Cerro Alto presento 04 genotipos, el más frecuentes fue BBBAABBBAABBBABAABABB (16 ind. = 76.19%). Habana presento 03 genotipos, el más frecuente fue ABBBABBABAAABABBBABB (18 ind. = 85.71%). Finalmente Tununtunumba presentó solo 02 genotipos, siendo el más frecuente: ABAABABBBBAAABABABABB (20 ind. = 95.24%) ver figura 09.

5.4. ANÁLISIS FACTORIAL DE CORRESPONDENCIA (AFC)

Los resultados del análisis factorial de correspondencia (AFC), mostraron que las cuatro poblaciones en estudio forman entidades genéticas independientes, presentando cada población una estructuración genética definida. De las cuales, las poblaciones más próximas genéticamente fueron Shica y Cerro Alto (Figura 10). Los tres primeros factores explican el 75.53% de la varianza total, con valores de 44.20%, 18.37% y 12.96% respectivamente para cada uno de los factores.

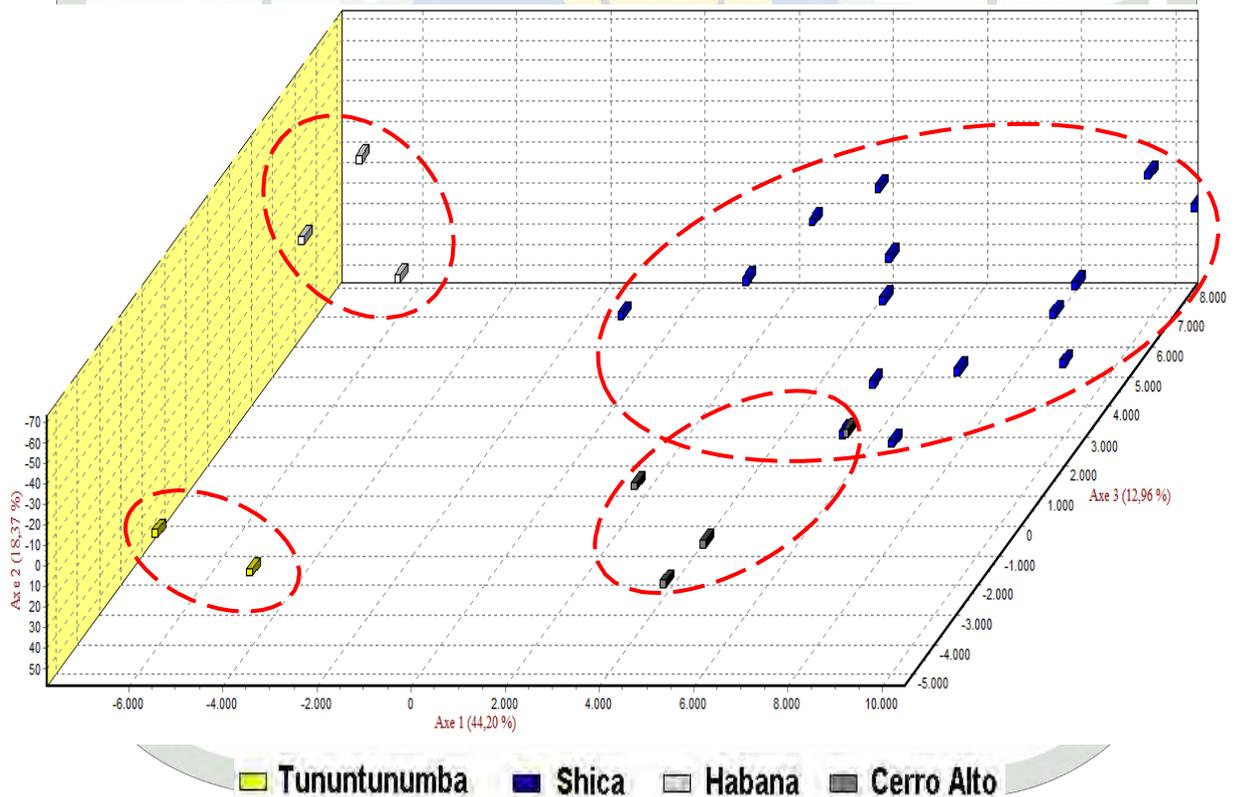


Figura 10: Representación gráfica de los resultados de Análisis Factorial de Correspondencia (AFC). Los puntos están distribuidos sobre un plan factorial tridimensional: eje 01 (inerencia 44.20%), eje 02 (inerencia 18.37%) y eje 03 (inerencia 12.96%) para las cuatro poblaciones naturales de sacha inchi *Plukenetia volubilis* L. en función a sus genotipos.

5.5. RELACIONES INTERPOBLACIONALES

El dendrograma (Figura 11) elaborado a partir de los genotipos obtenidos con los marcadores polimórficos, mostró que existe una diferenciación genética entre las cuatro poblaciones estudiadas, debido a que los individuos que conforman cada población tienden a agruparse entre ellos, que con los individuos de otras poblaciones; conservando así, cada población su identidad genética. Las poblaciones de Shica y Cerro Alto se encuentran más cercanamente relacionadas en comparación con las otras poblaciones, confirmando la estructuración observado en el

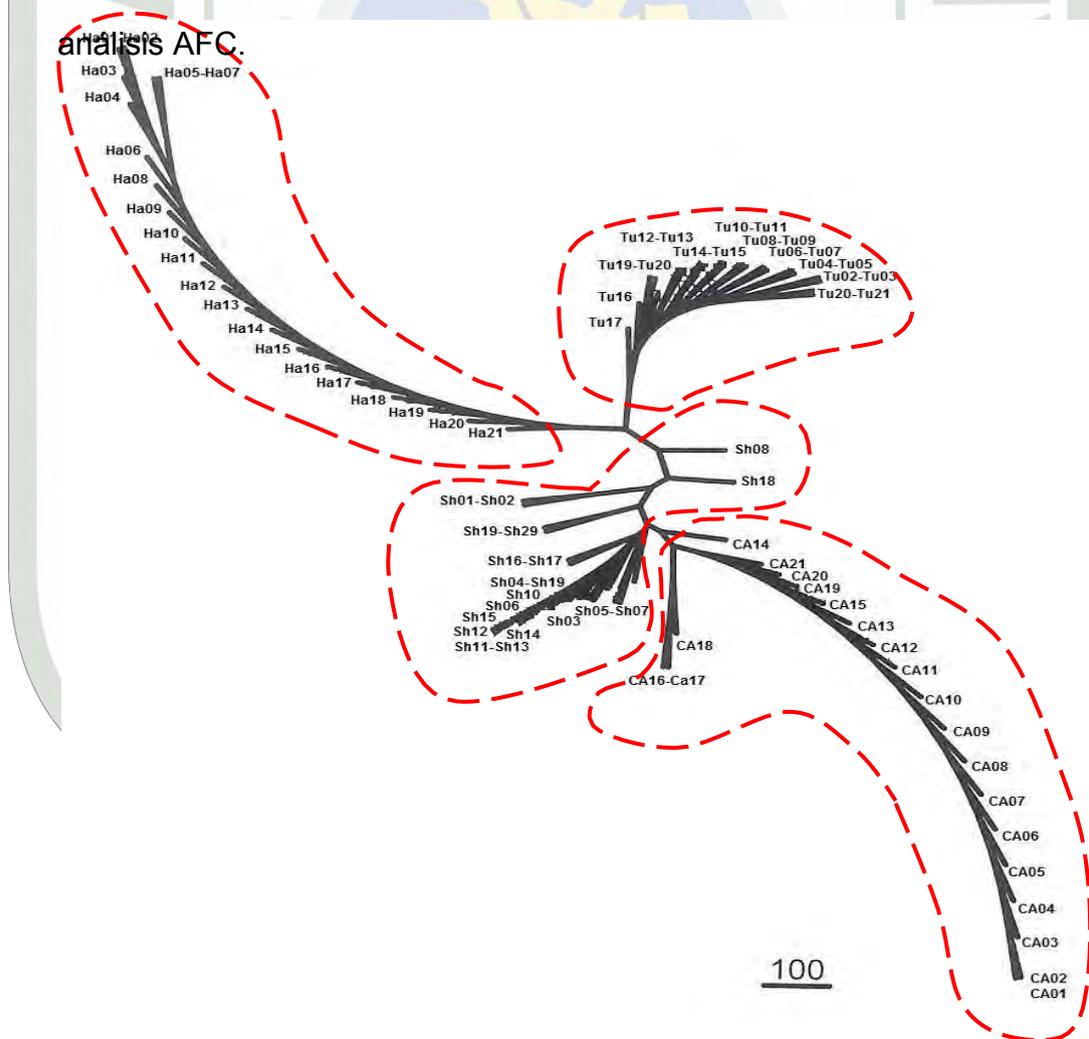


Figura 11: Dendrograma generado a partir de los genotipos obtenidos de las bandas informativas de las cuatro poblaciones naturales de sachá inchi *Plukenetia volubilis* L. (100 = distancia genética).

5.6. DIFERENCIACIÓN ENTRE POBLACIONES (F_{st})

Los resultados del F_{st} estimado para cada par de poblaciones, mostraron una diferenciación genética muy alta entre las cuatro poblaciones (Tabla 06), según la escala propuesta por Hartl y Clark, (1997). Siendo las poblaciones de Tununtunumba y Cerro Alto que mostraron la mayor diferenciación ($F_{st} = 0.9506$, $P < 0.001$). En tanto, la población de Cerro Alto al compararse con Shica mostró la menor diferenciación genética ($F_{st} = 0.5429$, $P < 0.001$). Todos los resultados fueron estadísticamente significativos ($P < 0.001$).

Tabla 06: Matriz del estimador F_{st} para las cuatro poblaciones naturales de sachá inchi *Plukenetia volubilis* L.

Poblaciones	Tununtunumba	Shica	Habana	Cerro Alto
Tununtunumba	---	0.8260***	0.9487***	0.9506***
Shica		---	0.7955***	0.5429***
Habana			---	0.9275***
Cerro Alto				---

*** Altamente significativo a $P < 0.001$

5.7. DISTANCIA GENÉTICA

La distancia genética (Tabla 07) estimada según Reynolds, *et al.* (1983), mostró que las poblaciones de Shica y Cerro Alto fueron más próximas genéticamente ($D = 0.7829$). Mientras que las poblaciones más distantes fueron Tununtunumba y Cerro Alto ($D = 3.0082$).

Tabla 07: Matriz de distancia genética para las cuatro poblaciones naturales de sachá inchi *Plukenetia volubilis* L.

Poblaciones	Tununtunumba	Shica	Habana	Cerro Alto
Tununtunumba	---	1.7486***	2.9706***	3.0082***
Shica		---	1.5873***	0.7829***
Habana			---	2.6235***
Cerro Alto				---

*** Altamente significativo a $P < 0.001$

Relaciones filogeográficas entre las poblaciones

La Figura 12, describe gráficamente las distancias genéticas estimadas según

Reynolds *et al.* (1983), que permite observar la formación de dos grupos: el grupo A que engloba a tres poblaciones, está dividido en dos subgrupos, el primero formado por la población de Habana y el segundo formado por las poblaciones Shica y Cerro Alto que se encuentran estrechamente relacionadas; y el grupo B formado únicamente por la población de Tununtunumba. Los resultados de bootstrap (100) muestran una alta sostenibilidad o confiabilidad de las relaciones encontradas.

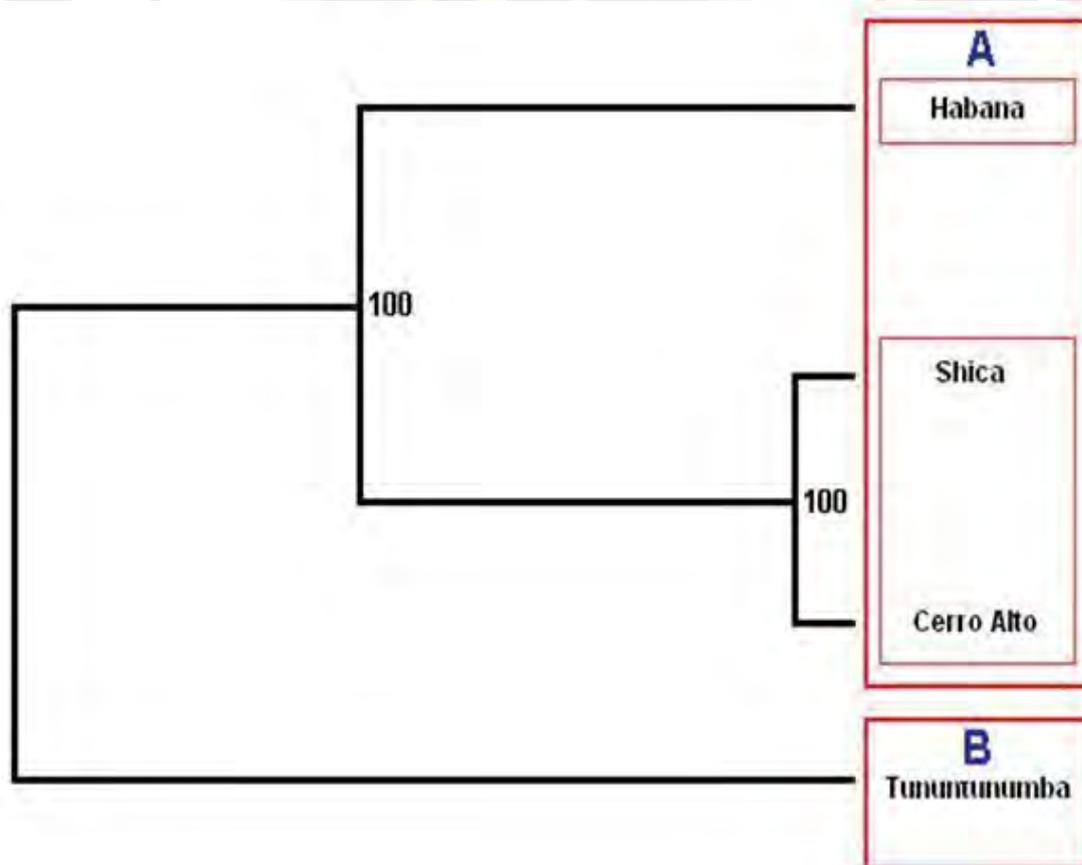


Figura 12: Dendrograma de similitud (UPGMA) generado con la distancia genética de Reynolds, *et al.* (1983), entre todas las poblaciones de saha inchi *Plukenetia volubilis* L. Los valores de bootstrap (100) en cada nudo (unión) indican la robustez (solidez de la relaciones).

5.8. CORRELACIÓN ENTRE LAS DISTANCIAS GENÉTICA Y GEOGRÁFICA

La figura 13 muestra que no existe una correlación ($r = 0.12$) entre las distancias geográfica (Km) y genética (Reynolds *et al.* 1983) entre las cuatro poblaciones estudiadas; sin embargo, cuando no se consideró a la población Tununtunumba (excluida de las demás poblaciones según el dendrograma en base a la distancia genética) el valor del coeficiente de correlación aumenta a ($r = 0.89$), mostrando una correlación.

Tabla 08: Matriz de las distancias geográfica y genética para las cuatro poblaciones naturales de sacha inchi *Plukenetia volubilis* L. utilizada en el análisis de correlación.

Poblaciones	D. Geográfica (km)	D. Genética (Reynolds <i>et al.</i> 1983)
Tununtunumba-Cerro Alto	21	3.0082
Shica-Cerro Alto	46	0.7829
Habana -Shica	53	1.5873
Shica-Tununtunumba	67	1.7486
Habana-Cerro Alto	100	2.6235
Tununtunumba-Habana	120	2.9706

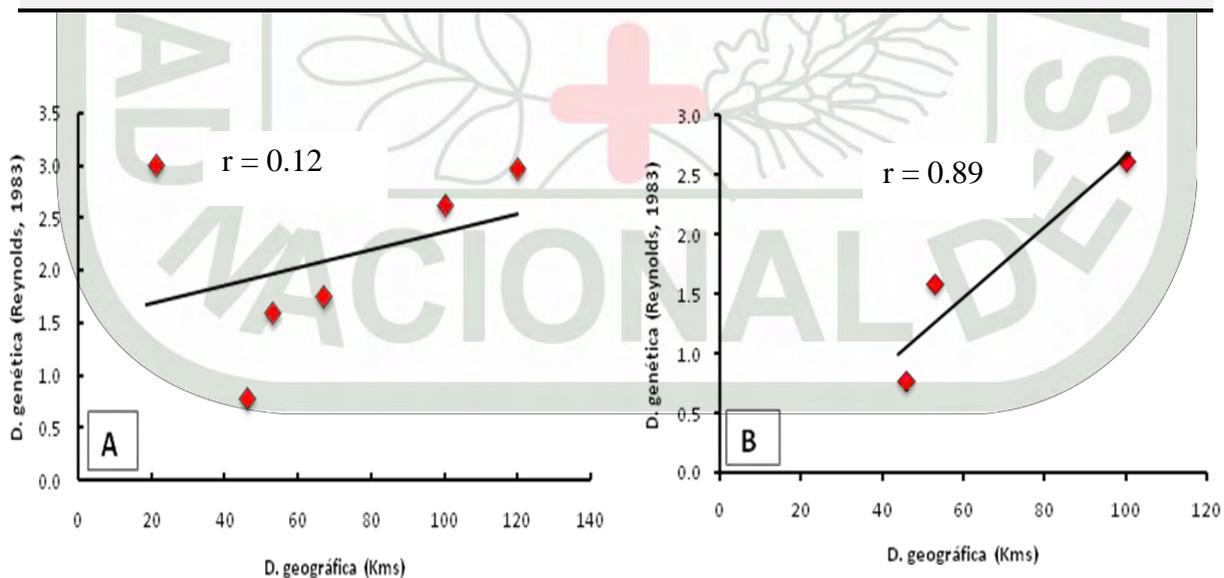


Figura 13: Representación gráfica del análisis de correlación: **A)** Cuatro poblaciones. **B)** Tres poblaciones.

VI. DISCUSIONES

La técnica DALP

La técnica DALP, es una eficiente herramienta molecular aplicable a diferentes especies de plantas y animales, que según la especie estudiada presentara más o menos lugares (bandas) informativas (Perrot-Minnot *et al.* 2000). Esta técnica fue utilizada por primera vez por Desmarais *et al.* en 1998, para diferenciar dos sub especies de ratones (*Mus musculus musculus* y *M. musculus domesticus*), encontrando hasta ocho bandas informativas (diferenciales) a nivel intraespecífico; así mismo, estos autores mostraron la universalidad de esta técnica utilizándola en otras especies animales como la tilapia (*Oreochromis niloticus* y *Sarotherodon melanotheron*), aves (*Larus cachinnans* y *L. audouinii*), mejillones (*Mytilus galloprovincialis* y *M. edulis*) y un acaro (*Amblyseius californicus*). Esta técnica, también fue utilizada exitosamente para estudiar el polimorfismo (diferencias) en especies vegetales medicinales como *Panax ginseng* y *Panax quinquefolius* (Ha, W. Y. *et al.* 2001); y diez poblaciones naturales de *Stephania yunnanensis* (Yun-shu *et al.* 2008), obteniéndose resultados informativos a nivel intra e interpoblacional. En base a esta información de universalidad de la técnica DALP, nosotros la utilizamos para estudiar la variabilidad genética en poblaciones naturales de sachá inchi *Plukenetia volubilis* L. en la región de San Martín, obteniendo resultados exitosos en el análisis de pequeñas variaciones genéticas a nivel intra e interpoblacional; reportándose tres marcadores polimórficos (DALP 221, DALP 233, DALP 242) y cinco monomórficos (DALP 231, DALP 232, DALP 234, DALP 235, DALP 241) de los ocho marcadores analizados.

Variabilidad intrapoblacional

El estudio de la variabilidad genética intrapoblacional no solo define el status biológico de las poblaciones sino también provee información esencial sobre el estado de conservación actual de la especie (Gilpin & Soule, 1986; Barrett & Kohn, 1991; Ellstrand & Elam, 1993; Lande, 1999).

En las cuatro poblaciones naturales de sacha inchi, encontramos diferentes niveles de diversidad genética, reportándose un total de 24 genotipos diferentes distribuidos en Shica (15 genotipos), Cerro Alto (4 genotipos), Habana (3 genotipos) y Tununtunumba (2 genotipos). Nosotros pensamos que el nivel de variación genética observado en cada una de las poblaciones, podría estar relacionado con el grado de autogamia y alogamia que experimenta esta especie. Conociéndose que el sacha inchi presenta un sistema mixto de polinización de acuerdo a lo señalado por Cachique, (2006); por lo que suponemos que el nivel de variabilidad genética intrapoblacional dependerá del tamaño y densidad de cada población, que influenciaría para que un sistema de polinización (autogamia o alogamia) se exprese preferentemente más que el otro, aumentando o disminuyendo la variabilidad.

La población de Shica que muestra la mayor diversidad genética, es la que presenta el mayor tamaño y densidad poblacional, por lo que suponemos que la acción del viento y otros factores abióticos tienen un mejor efecto en la polinización cruzada (alogamia) en esta población, aumentando su diversidad genética. Esta hipótesis, se ve sustentada por Raven (1992), quien manifiesta que la polinización cruzada por acción del viento (anemofilia) no es muy eficaz entre individuos distantes, por no

logra abarcar grandes distancias; pero es eficiente si los individuos de una especie crecen unos junto a otros como es el caso de esta población. Los insectos no serían considerados como polinizadores directos en esta especie, debido a que estos visitan preferentemente solo a las flores masculinas más no las flores femeninas, por lo tanto no participarían de un flujo genético de forma directa (Cachique, 2006).

En contraste a la población de Shica, las poblaciones de Tununtunumba, Habana y Cerro Alto mostraron una baja diversidad genética (genotipos). Esto podría ser atribuido, a que estas poblaciones presentan un menor tamaño y densidad poblacional, lo que habría dificultado la acción del viento en la polinización cruzada entre plantas dentro de cada una de estas poblaciones. Pudiendo experimentar procesos de deriva genética, favorecidos por una autofecundación constante que hayan homogenizado los genotipos, disminuyendo los niveles de variabilidad genética en estas poblaciones.

La existencia de una mayor variabilidad genética poblacional, permite explorar más variantes genéticas aprovechables para el hombre, además que incrementa la probabilidad de subsistencia de las poblaciones en el tiempo (Jehle *et al.* 2001). En este sentido, la mayor diversidad genética encontrada en Shica hace que esta población sea considerado un buen stock genético para el sacha inchi y que su material genético (semillas) sean considerado como candidato para futuros programas de mejoramiento genético. Las poblaciones de Cerro Alto, Habana y Tununtunumba que presentan reducida variabilidad genética (pocos genotipos), son las más propensas a desaparecer, debido a que su capacidad para adaptarse a

cambios ambientales es reducida y su capacidad de sobrevivir a largo plazo puede ser comprometida (Lande, 1999).

Variabilidad interpoblacional

Los resultados del AFC, mostraron que las cuatro poblaciones evaluadas forman entidades genéticas fuertemente estructuradas. Estos resultados son corroborados por el F_{st} , dendrograma y la distancia genética (D) entre cada una de las poblaciones.

Reportes de la literatura, muestran que las poblaciones de plantas autóгамas están fuertemente estructuradas en líneas puras, en comparación de las plantas alógamas que generalmente no presentan una estructuración definida (Jain, 1975; Loveless & Hamrick, 1984; Brown, 1990; Godt y Hamrick, 1998). El sachá inchi, que presenta un sistema mixto de polinización, mostró con la técnica DALP una fuerte estructuración genética (AFC) en cada una de las cuatro poblaciones evaluadas. Esto se podría atribuir a que el sistema mixto de polinización que experimenta esta especie estaría actuando preferentemente, solo entre los individuos de cada población; conservando así, cada una su identidad genética.

Los niveles de diferenciación genética (F_{st}) encontrados entre las cuatro poblaciones naturales de sachá inchi son muy altos según la escala establecida por Hartl & Clark (1997). Estos niveles altos de diferenciación podrían ser atribuidos a la restricción del flujo genético resultante de un conjunto de factores como: la presencia de barreras naturales, la distancia geográfica y el sistema mixto de polinización que actuaría preferentemente a nivel intrapoblacional. A esto se podría sumar que en décadas recientes, la deforestación y el daño de los bosques con la consecuente

fragmentación de los mismos, podría haber dificultado todavía más el flujo genético entre las poblaciones naturales de sachá inchi. Contribuyendo fuertemente al aislamiento de las mismas, o a la disminución drástica de los agentes polinizadores ó dispersores de semilla (si existieran) de esta especie, a los cuales les sería cada vez más difícil salvar las distancias entre los fragmentos, causando a la larga una fuerte diferenciación genética entre las poblaciones estudiadas.

En *Croton alabamensis* otra Euphorbiaceae que presenta un sistema mixto de polinización (Farmer, 1962) similar al sachá inchi, Benjamín *et al.*, (2006), reportaron un F_{st} promedio de 0.28 entre poblaciones naturales, obtenido con la técnica AFLP (marcador con características muy similares al DALP). Mientras que en el sachá inchi nosotros reportamos un F_{st} promedio de 0.83 entre poblaciones naturales. Esta diferenciación del F_{st} entre las poblaciones de estas dos especies podría ser explicada por la diferencia en los agentes polinizadores y sus preferencias. En el *Croton alabamensis*, la polinización es realizada directamente por los insectos según observaciones hechas por Benjamín *et al.* (2006), quienes mencionan que estos visitan tanto a flores masculinas como a flores femeninas, lo que podría estar favoreciendo el flujo genético entre las poblaciones de esta especie, disminuyendo los niveles de F_{st} . En cambio en el sachá inchi la polinización estaría más fuertemente influenciada por acción del viento, que tiene un área de acción solo dentro de cada población, lo cual contribuiría al aislamiento genético entre las poblaciones por una disminución del flujo genético a consecuencia de la distancia geográfica y otros factores, trayendo como consecuencia un alto valor del F_{st} .

Relaciones filogeográficas entre las cuatro poblaciones

EL dendrograma (Figura 14) elaborado en base a la distancia genética de Reynolds *et al.* (1983), muestra la formación de dos grupos: el grupo A conformado por tres poblaciones (Habana, Shica, Cerro Alto) divididas en dos sub grupos y el grupo B conformado únicamente por una población (Tununtunumba). Para comprender las relaciones existentes entre estas poblaciones de *sacha inchi*, se debe considerar la existencia de dos efectos sobre los resultados obtenidos: Primero, la influencia de la distancia geográfica en la diferenciación genética entre las poblaciones pertenecientes al grupo A. Existiendo una correlación ($r = 0.89$) entre la distancia genética y la distancia geográfica, que podría ser atribuido a que estas poblaciones se encuentran ubicadas geográficamente fuera de la influencia de la “Cordillera Escalera”. Segundo, la influencia de la “Cordillera Escalera” como una barrera geográfica natural (altitud: 1119 m.s.n.m) que separa en gran parte a la población de Tununtunumba (grupo B) de las demás poblaciones (grupo A). No existiendo una correlación ($r= 0.12$), debido a que las poblaciones que se encuentran más cercanas geográficamente (21 Km) presentan la mayor distancia genética ($D= 3.0082$), similar a la obtenida entre las poblaciones ($D= 2.9706$) que se encuentran más distantes geográficamente (120 Km).

A nivel genético la población Tununtunumba se encuentra excluida del conjunto formado por las poblaciones de grupo A, lo que concuerda con la presencia de la cordillera escalera, por lo que se presume que la cordillera escalera, estaría actuando como una barrera geográfica natural que limita a un posible flujo genético de esta con las demás poblaciones aumentando los niveles de diferenciación genética observado.

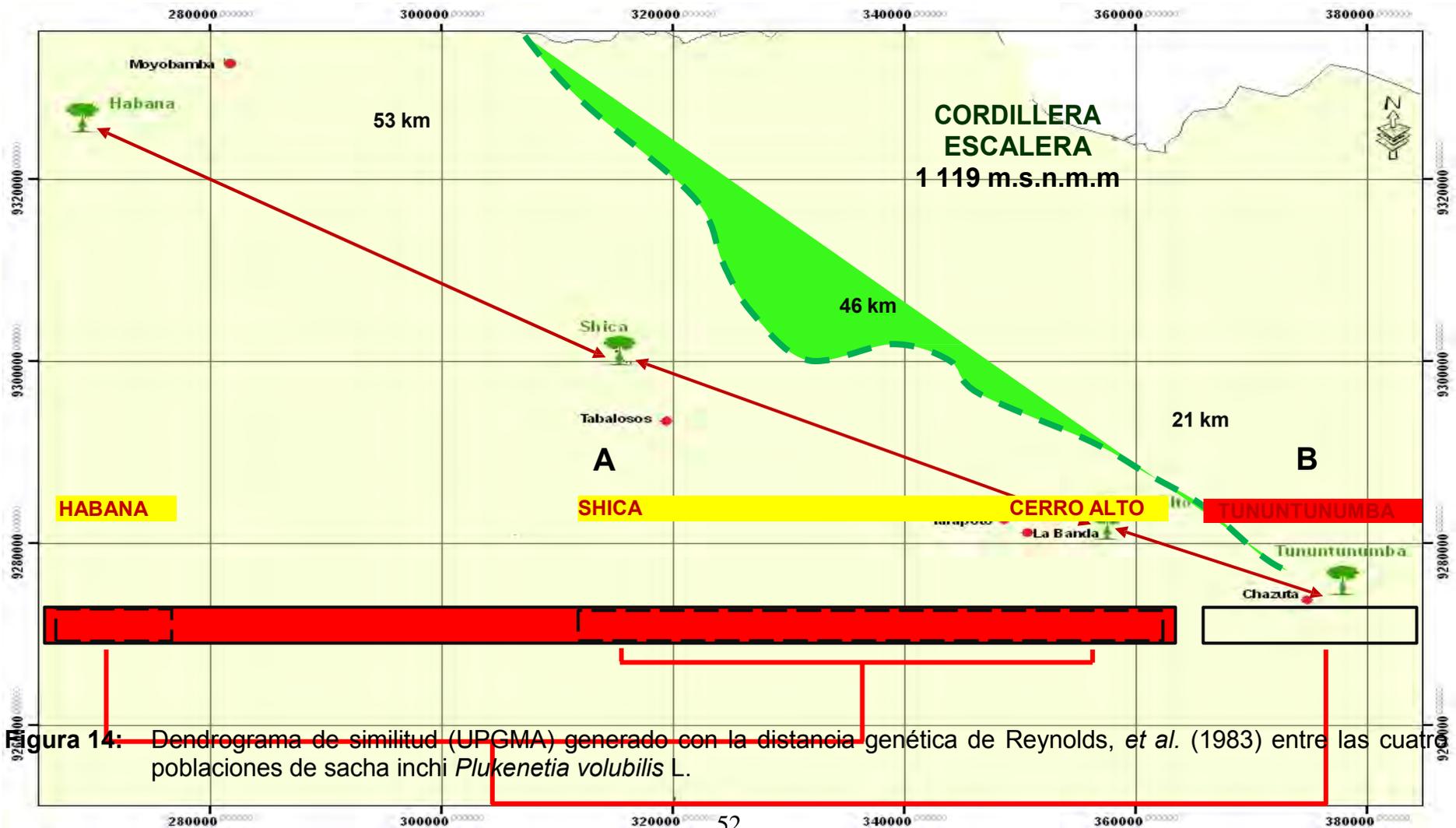


Figura 14: Dendrograma de similitud (UPGMA) generado con la distancia genética de Reynolds, *et al.* (1983) entre las cuatro poblaciones de sachu inchi *Plukenetia volubilis* L.



VII. CONCLUSIONES

- 7.1. La técnica DALP es un marcador molecular informativo para el estudio del sachá inchi *Plukenetia volubilis* L. a nivel intra e interpoblacional, revelando un polimorfismo genético expresado en 24 genotipos diferentes distribuidos entre las cuatro poblaciones naturales.
- 7.2. Las cuatro poblaciones naturales forman entidades genéticas independientes, presentando cada población una estructuración genética definida.
- 7.3. La cordillera escalera que forma un cordón montañoso altitudinal que separa en gran parte a la población Tununtunumba de las demás poblaciones, cumpliría una función importante en la diferenciación genética entre estas poblaciones, expresados en un aumento de los niveles e diferenciación genética.
- 7.4. Los marcadores DALP 221 y DALP 242, son diagnósticos (exclusivos) para las poblaciones de Tununtunumba y Shica respectivamente, mostrando bandas exclusivas para la caracterización genética de estas dos poblaciones.
- 7.5. La población de Shica presentó la mayor diversidad genética entre las cuatro poblaciones estudiadas representando un stock genético para esta especie, debido a que permite explorar más variantes genéticas aprovechables.

VIII. RECOMENDACIONES

Estos resultados son un primer paso para incentivar y continuar con estudios que enfoquen y aclaren muchas interrogantes en esta especie. En función a los resultados presentados se puede definir algunos puntos que pueden ser abordados a futuro.

- 8.1. Para futuros trabajos de genética de poblaciones en sachá inchi *Plukenetia volubilis* L. se recomienda ampliar el número de poblaciones a otras regiones de la Amazonía peruana, así como estudiar poblaciones naturales intermedias a las poblaciones estudiadas en la región de San Martín.
- 8.2. Complementar el presente trabajo, con investigaciones a nivel de campo en la poblaciones evaluadas, a fin de poder relacionar los perfiles genéticos (genotipos) obtenidos, con alguna característica morfológica de cada población.
- 8.3. Considerar a la población de Shica, como stock genético para futuros trabajos de mejoramiento genético de esta especie, como también realizar cruzamientos entre las poblaciones más distantes genéticamente (Tununtunumba – Cerro Alto) con la finalidad de obtener nuevas variantes genéticas aprovechables.

IX. RESUMEN

En la Amazonía, la familia Euphorbiaceae está constituida por especies de gran importancia económica como lo es el sacha inchi *Plukenetia volubilis* L. Actualmente esta especie viene siendo ampliamente investigada a nivel de cultivo, pero existe una reducida información a nivel genético, especialmente en poblaciones naturales. En este sentido, el presente estudio pretende contribuir al conocimiento de la variabilidad genética del sacha inchi en poblaciones naturales de la región San Martín, evaluadas mediante la técnica molecular DALP. Para lo cual, un total de 83 muestras fueron colectadas en las localidades de Habana (21), Shica (20), Cerro Alto (21) y Tununtunumba (21). El estudio fue basado en el análisis de ocho marcadores DALP; de los cuales, tres (DALP221, DALP233 y DALP242) resultaron ser informativos para esta especie, mostrando diferencias a nivel intra e interpoblacional. Los resultados del Análisis Factorial de Correspondencia (AFC), Índice de fijación (promedio de $F_{st} = 0.83$) y distancia genética (promedio de $D = 2.56$) muestran que las cuatro poblaciones estudiadas forman entidades genéticas independientes. Esto, podría ser atribuido al sistema mixto de polinización (autógamo y alógamo) presente en esta especie, que estaría actuando preferentemente dentro de cada población y no entre las poblaciones. A nivel intrapoblacional, la población Shica presentó la mayor diversidad genética (15 genotipos) entre las cuatro poblaciones estudiadas, lo cual estaría relacionado con el mayor tamaño y densidad poblacional, que favorecería la polinización cruzada, trayendo como consecuencia una mayor diversidad genética. La alta divergencia (diferenciación) genética encontrada entre las cuatro poblaciones evaluadas, podría ser causada por la ausencia de insectos polinizadores directos, así como por la

presencia de barreras naturales y por la distancia geográfica entre ellas, que estaría restringiendo el flujo de genes entre las poblaciones.



X. SUMMARY

In the Amazon area, the Euphorbiaceae family is constituted by species of great economic importance such as *sacha inchi* *Plukenetia volubilis* L. (Linnaeus, 1753). Currently this species has been investigated concerning culture, but there is little about its genetic information, especially in natural populations. In this regard the present investigation tries to contribute to the knowledge of the genetic variability of *sacha inchi* in natural populations of the San Martín region. These populations were evaluated by means of the molecular technique DALP. A total of 83 samples collected in the localities of Havana (21), Shica (20), Cerro Alto (21) and Tununtunumba (21) was analyzed with the technique DALP "Direct Amplification of Length of Polymorphism". From eight DALP markers used, three turned out to be informative (DALP221, DALP233 y DALP242), showing differences at an intra and inter-population level. The results of the AFC, index of fixation (average of $F_{st} = 0.82$) and genetic distance (average of $D = 2.56$) show that the four populations form independent genetic organizations. This could be attributed to the mixed pollination system (autogamy and allogamy) present in this species. That would be acting preferably only between the individuals of each population, but not between different populations. At an intrapopulation level the population of Shica has the greatest genetic diversity (15 genotypes) of the four studied populations, which would be related to the great size and population density. This would favor the cross-fertilization, having as a consequence a greater genetic diversity. The high genetic diversity between the four populations of this species could be due to the absence of direct pollinizer insects as well as the presence of natural barriers and the geographic

distance between them, which would be restricting the gene flow between the populations.



XI. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. **Anaya, J. 2003.** Proyecto Omega, Plan de Comercialización. Aceite y Harina Proteica de inca inchi. Agroindustrias Amazónicas, Informe técnico. Tarapoto, Perú. 17 pp.
2. **Albert, B.; Bray, D.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K. & Watson, J. D. (1994).** Molecular biology of the cell. Garland Publishing, Inc. Barcelona. 3ra Edition. New York - London. 291-292 pp.
3. **Arévalo, G. 1990-1995.** Colección, caracterización y mantenimiento de germoplasma de oleaginosas nativas en Tarapoto, Perú. INIA, Estación Experimental El Porvenir. Informe Anual 1990-1995. Tarapoto s.p.
4. **Arévalo, G. 1995.** El cultivo del sacha inchi (*Plukenetia volubilis L.*) en la Amazonía. Programa Nacional de Investigación en Recursos Genéticos y Biotecnología - PRONARGEB, Estación Experimental El Porvenir – Tarapoto, Perú. 21 pp.
5. **Avise, J. C. & Hamrick J. L. 1996.** Conservation Genetics: Case Histories from Nature: Chapman & Hall. New York.
6. **Ayala, F. J. & Kiger, J. A. 1984.** Genética moderna. Omega. Barcelona.
7. **Azofeifa-delgado, 2006.** Uso de marcadores moleculares en plantas; aplicaciones en frutales del trópico. Agronomía Mesoamericana. Vol. 17(2): 221-242 pp.

8. **Barrett, S. C. H. & Kohn, J. R. 1991.** Genetic and evolutionary consequences of small population size in plants: implications for conservation. In: Falk, D. A. and Holsinger, K. E. (eds) *Genetics and Conservation of Rare Plants*, Oxford University Press, Oxford. 3-30 pp.
9. **Belkhir, K.; Borsa, P.; Chichi, I.; Raufast, N. & Bonhomme, F. 2004.** **GENETIX 4.05.2**, logiciel sous windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire génome, populations, interactions, CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II, Montpellier, France.
10. **Benjamin, W.; Van, E.; Nicolas, J.; Paul, E. B. & Andrew L. P. 2006.** Phylogeny and biogeography of *Croton alabamensis* (Euphorbiaceae), a rare shrub from Texas and Alabama, using DNA sequence and AFLP data. *Molecular Ecology*. Vol. 15: 2735–2751 pp.
11. **Brack, A. 1999.** *Plukenetia volubilis* L. Diccionario Enciclopédico de Plantas Útiles del Perú. PNUD. Cuzco – Perú. 550 pp.
12. **Brown, A. H. D. 1990.** Genetic characterization of plant mating systems. Brown, A. H. D., Clegg, M. T., Kahler, A. L. and Weir, B. S. *Plant populations genetics, breeding, and genetic resources*. Sinauer, Sunderland, Massachusetts. 145-162 pp.
13. **Cachique, D. 2006.** Estudio de la Biología Floral y Reproductiva en el Cultivo de Sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.) INIEA-UNSM. Tesis de pregrado. San Martín-Perú. 70 pp.
14. **Cachique, D. & Vásquez, G. 2007.** Avance en obtención de líneas autofecundadas de ecotipos promisorios de *Plukenetia volubilis* L. en San Martín. Artículo técnico –PET-IIAP.

15. **Correa, J. E. & Bernal, H. Y. 1992.** Especies vegetales promisorias de los países del Convenio Andrés Bello (Esp. Veg. Prom.) Vol. 7:577-596 pp.
16. **Desmarais, E.; Laneluc, I. & Lagnel, J. 1998.** Direct amplification of length polymorphisms (DALP) or how to get and characterize new genetic markers in many species. *Nucleic Acids Research*, 1998, Vol. 26, 6:1458 • 1465 pp.
17. **Doyle, J. J. & Doyle J. L. 1987.** A rapid ADN isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.* Vol. 19:11-15 pp.
18. **Eck, R. V. & Dayhoff, M. O. 1966.** Atlas of protein. Sequence and structure. National Biomedical Research. Foundation, silver spring. Maryland.
19. **Eizirik, E.; Kim, J.; Menotti, R.; Crawshaw, P.; Brien, S. & Johnson, W. 2001.** Phypogeography, population history and conservation genetics of jaguars (*Panthera onca*, Mammalia, Felidae). *Molecular Ecology*. Vol. 10:65-79 pp.
20. **Ellstrand, N. C. & Elam, D. R. 1993.** Population genetic consequences of small population size: implications for plant conservation. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* Vol. 24:217-242 pp.
21. **Farmer, J.A. 1962.** An ecological life history of *Croton alabamensis* EA Smith ex Chapman. PhD Thesis, University of Alabama.
22. **Felsenstein J. 1993.** **PHYLIP** (Phylogeny inference package) versión 3.05 general informtion manual. University of Washingtgon, seattle, Washington. 132pp.

23. **Ferreira, M. E. & Gratapaglia, D. 1998.** Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3ª ed. Brasília: EMBRAPA – CENARGEN, 220 pp.
24. **Futuyma, D. 1986.** Evolutionary biology. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts. 223-231 pp.
25. **Galtier, N.; Depaulis, F. & Barton, N. 2000.** Detecting bottlenecks and selective sweeps from DNA sequence polymorphism. *Genetics*. Vol 155: 981-987 pp.
26. **Gazel, C. 1999.** Variabilité génétique de formes cavernicoles et épigees de *Trichomycterus* (Teleosteens, Siluriformes) de la région de Torotoro (Potosí-Bolivia). Effect de l'habitat sur la structuration génétique des populations. Université de Provence Aix-Marseille I.
27. **Gentry, A. 1993.** A Field guide to the Families and Genera of woody Plants of nor west South America (Colombia, Ecuador, Perú) with supplementary notes on herbaceous taxa. Department of Conservation, Biology – Conservation International. Washington, D.C. - USA. 95 pp.
28. **Gilpin, M. E. & M. E. Soulé. 1986.** Minimum viable populations: processes of species extinction. *In: SOULÉ M. E. (ed.), Conservation biology: the science of scarcity and diversity*. Sinauer Associates, Massachusetts. 19-34 pp.
29. **Gillespie, L. J. 1993.** A synopsis of Neotropical *Plukenetia* (Euphorbiaceae) including two new species. *Systematic Botany*. Vol. 18 (4): 575 – 592 pp.

30. **Gillespie, L. J. & Armbruster, W. S. 1997.** A contribution of the Guianan Flora: *Dalechampia*, *Haematostemon*, *Omphalea*, *Pera*, *Plukenetia* and *Tragia* (Euphorbiaceae). Smithsonian Contribution to Botany, number 86. Smithsonian Institution Press. Washington, D. C. 48 pp.
31. **Godt, M. J. W. & Hamrick, J. L. 1998.** Allozyme diversity in the grasses. In: Cheplick, G. P. Populations Biology of grasses. Cambridge University press. 11-29 pp.
32. **Guillén, D. M.; Ruiz, A.; Cabo, N.; Chirinos, R; & Pascual, G. 2003.** Characterization of Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis* L.) Oil by FTIR Spectroscopy and 1H NMR. Comparison with Linseed Oil. Universidad Agraria de La Molina Lima-Perú. Vol. 80:775-763 pp.
33. **Ha, Wai. Yan.; Yau, F. C.; But, P. P.; Wang, J. & Shaw, P. C. 2001.** Direct amplification of length polymorphism analysis differentiates Panax ginseng from P. quinquefolius. *Planta medica*. Vol. 67(6):587-9 pp.
34. **Hamaker, B. R.; Valles, C.; Gilman, R.; Hardmeier, R. M.; Clark, D.; García, H.H.; Gonzales, A. E.; Kohlstad, I.; & Castro, M. 1992.** Amino Acid and Fatty Acid Profiles of the Inca Peanut (*Plukenetia volubilis* L.), *Cereal Chem*. Vol. 69:461-463 pp.
35. **Hartl, D. & Clark, A. 1997.** Principles of population genetics. Sinauer Associates, Inc. Publishers Sunderland, Massachusetts, 683 pp.
36. **Heath, D., Busch, C., Kelly, Joanne & Atagi, D. 2002.** Temporal change in genetic structure and effective population size in steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Mol. Ecol*. Vol. 11:197-214 pp.

37. **Hoarau, G., & Borsa, P. 2000.** Extensive gene flow within sibling species in the deep-sea fish *Beryx splendex*. CR Acad Sci France. Vol. 323:315–325 pp.
38. **Innis, S. M. 1991.** Essential Fatty Acids in Growth and Development. Prog. Lipid Res. Vol. 30:39-103 pp.
39. **Jain, S. K. 1975.** Populations structure and affects of breeding systems. In Frankel. O. H. and Hawker, J. G. Crop genetic resources for today and tomorrow. Cambridge University Press. 15-36 pp.
40. **Jehle, R., Arntzen, W., Burke, A., Krupa, P., & Hold, W. 2001.** The annual number of breeding adults and the effective population size of syntopic newts (*Triturus cristatus*, *T. marmoratus*). Molecular Ecology. Vol. 10:839-850 pp.
41. **Judd, W.; Campbell, C.; Kellogg, E.; Stevens, P. 1999.** Plant Systematics: A Phylogenetic Approach. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, MA, USA. 464 pp.
42. **Kalliola, R. 1993.** Amazonía Peruana, vegetación húmeda tropical en el llano subandino. Proyecto Amazonía, Universidad de Turku; Turku, Finlandia. 265 pp.
43. **Karp, A.; Edwards, K. 1998.** DNA markers: a global overview. In: G. Caetano-Anollés, P.M. eds. DNA markers: protocols, aplicaciones and overviews. Gresshoff. New York. 1-13 pp.
44. **Kothe, M. S. 1998.** Marcadores Moleculares em Plantas. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, RS, Brasil. 137 pp.

45. **Lande, R. 1999.** Extinction risks from anthropogenic, ecological and genetic factors. In: LANDWEBER, L. F. & A. P. DOBSON (eds.) *Genetics and the extinction of species. DNA and the conservation of biodiversity.* Princeton University Press, Princeton, New Jersey. 1-22 pp.
46. **Loveless, M. D. & Hamrick, J. L. 1984.** Ecological determinants of genetic structure in plants populations. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 15: 69-95 pp.
47. **Macbride F. J. 1951.** Euphorbiaceae. *Flora de Perú.* Volumen 13. Parte 3A. 3-200 pp.
48. **Manco, E. 2006.** Cultivo de sachá inchi. INIEA – SUDIRGEB – Estación Experimental Agraria “EL PORVENIR”, Tarapoto, San Martín – Perú.
49. **Maniatis, T.; Fritsch, E. F. & Sambrook, A. 1989.** Molecular cloning a laboratory manual. Cold spring harbor laboratory. Second Edition. New York. 6-60 pp.
50. **Mendel, G. 1866.** Versuche über Pflanzen-Hybriden. *Verhandlungen des Naturforschenden Vereins in Brünn.* 4: 3-47 pp.
51. **Mejía, K., 1995.** Diagnostico de recursos vegetales de la amazonia peruana. Instituto de Investigaciones de la Amazonia Peruana. Documento técnico N°16.
52. **Mills, L. S. & Tallmon, D.A. 1999.** The role of genetics in understanding forest fragmentation. In: Rochelle JA, Lehmann LA, Wisniewski J eds. *Forest fragmentation: wildlife and management implications.* Boston: Brill, 171–186 pp.
53. **Mitton, J. B. 1997.** *Selection in natural populations.* Oxford University Press: Oxford. 240 pp.

54. **Moritz, C. 1999.** Conservations units and translocations: strategies for evolutionary processes. *Hereditas*. Vol. 130:217-228 pp.
55. **Mullis, K.; Faloona, F.; Scharf, S.; Saiki, R.; Horn, G. & Erlich, H. 1986.**
Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* Vol. 51:263-273.
56. **Navajas, M. & Feton, B. 2000.** The application of molecular markers in the study of diversity in acarology: a review *Experimental and Applied Acarology*. 2001 Kluwer Academic Publishers. Printed in the Netherlands. Vol. 24: 751-774 pp.
57. **Orell, M., Latí, K., Koivula, K., Rytönen, S., & Welling, P. 1999.**
Immigration and gene flow in a northern willow tit (*Parus montanus*) population. Department of biology, Finland. Vol. 12:283-295 pp.
58. **Page, R. D. M. 1996. TREEVIEW**, Tree drawing software for Apple Macintosh and Microsoft Windows. Division of Environmental and Evolutionary Biology, Institute of Biomedical and Life Sciences, University of Glasgow. Glasgow, Scotland, UK.
59. **Perrot-Minnot, M.J., Lagnel, J., Desmarais, E. & Navajas, M. 2000.**
Isolation and characterization by direct amplification of length polymorphism (DALP) of codominant genetic marker with mendelian inheritance in *Neoseiulus californicus* (Acari: Phytoseiidae). *Exp. Appl. Acarol.* Vol. 24: 795-803 pp.
60. **Phillips-Mora, W.; Rodríguez, H. & Fritz, P. 1995.** Marcadores de ADN: Teoría, aplicaciones y protocolos de trabajo con ejemplos de investigaciones en cacao (*Theobroma cacao*). Serie técnica. Informe técnico # 252. CATIE. Turrialba, Costa Rica. 183 pp.

61. **Phillips-Mora, W. 1998.** Biología molecular y marcadores moleculares en la agricultura. Memoria II Congreso Nacional de Estudiantes del sector Agropecuario Costarricense. IICA-EARTH-CATIE. 77-87 pp.
62. **Powell, W. 1992.** Plant genomes, gene markers, and linkage maps. *In*: Moss, J. P. ed. Biotechnology and crop improvement in Asia. Patancheru, India. International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics. 297-322 pp.
63. **Rallo, P.; Belaj, A.; De La Rosa, R. & Trujillo, I. 2002.** Marcadores moleculares (en línea). Córdoba, España. Consultado 1 ago. 2002. Disponible en http://www.extremadura21.com/caudal/hemeroteca/mayo-junio_2000/almazara/almazara1.htm
64. **Raven-Evert; Evert, R. & Eichhorn, E. 1992.** Biología de plantas. 773 pp.
65. **Reynolds, J.; Weir, C. C.; Cockerham. 1983.** Estimation of the coancestry coefficient: basis for a short-term genetic distance. *Genetics* Vol. 105:767-779 pp.
66. **Rossiter, S.; Jones, G.; Ransome, R. & Barratt, E. 2000.** Genetic variation and population structure in the endangered greater *Rinolophus ferrumequinum*. *Molecular Ecology*. Vol. 9:1131-1135 pp.
67. **Saunders, G. C., Juliet, D., Helen, C. P., & Johanne, H. C. 2001.** Interlaboratory Study on Thermal Cycler Performance in Controlled PCR and Random. Amplified Polymorphic ADN Analyses. *Clinical Chemistry*. Vol. 47 (1): 47-55 pp.
68. **SIDTA. 1999.** Los marcadores moleculares en ingeniería genética y en mejora vegetal. España. Consultado 1 agosto 2002.

69. **Slatkin, M. 1994.** Flujo génico y estructura de las poblaciones. Ecological genetics.
70. **Stryer, L. 1988.** Bioquímica. New York. 220 pp.
71. **Soukup, J. 1987.** Vocabulario de los nombres vulgares de la flora peruana y catálogo de los géneros. Editorial Salesiana. Lima – Perú. 436 pp.
72. **Tanksley, S. 1983.** Molecular markers in plant breeding. Plant Molecular Biology Reporter 1:3-8 pp.
73. **Tenover, F. C.; Robert D. A. & Goering, R. V. 1997.** the Molecular Typing Group of the Society for Healthcare Epidemiology of America. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. Infection Control and Hospital Epidemiology. Vol. 18 (6): 426-439 pp.
74. **Uauy, R.; Birch, E. & Birch, D. 1992.** Visual and brain function measurements in study of n-3 fatty acid requirements of infants. Journal of Pediatrics. Vol. 120: 168-180 pp.
75. **Valles, C. 1995.** Sacha Inchi, Importante Oleaginosa Selvática. Pura Selva, 40-41 pp.
76. **Wang, J. L. Hamrick & God M. J 1994.** High Genetic Diversity in *Sarracenia leucophylla* (Sarraceniaceae), a Carnivorous Wetland Herb. The American Genetic Association. Vol. 95(3):234–243 pp.
77. **Weir, B.S. 1991.** Análisis de datos genéticos. Sinauer, Sunderland, MA.
78. **Weir, B.S. & Cockerham, C. 1984.** Estimating F-statistics for the analysis of population structure. In: Evolution. Vol. 38:1358-1370 pp.

79. Yun-shu M.; Hong Y.; Yong-yi L.; Hong Y. & Xin C. 2008. A Study of Genetic Structure of *Stephania yunnanensis* (Menispermaceae) by

DALP. *Biochem Genet.* Vol. 46:227–240 pp.





ANEXOS

Anexo 01: Colecta, codificación y conservación del material biológico de sachá inchi *Plukenetia volubilis* L.



Anexo 02: Extracción de ADN del tejido foliar de Sacha Inchi *Plukenetia volubilis* L.



1 Pesado de muestra



2 Trituración de muestra



3 Macerado de muestra



4 Centrifugado de muestra



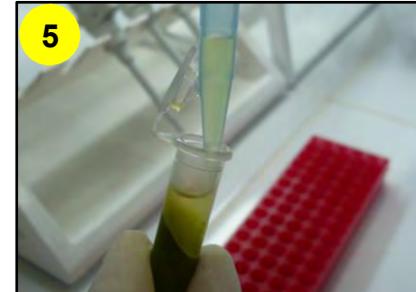
10 Hidratación del Pellet de ADN



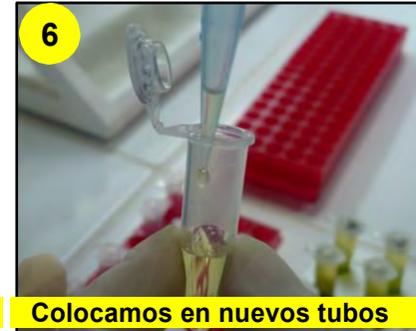
8 Lavado del Pellet de ADN



7 Congelación (2horas)



5 Extracción 500ul fase acuosa



6 Colocamos en nuevos tubos



9 Secado del pellet de ADN

Anexo 03: Espectrofotometría del ADN extraído.



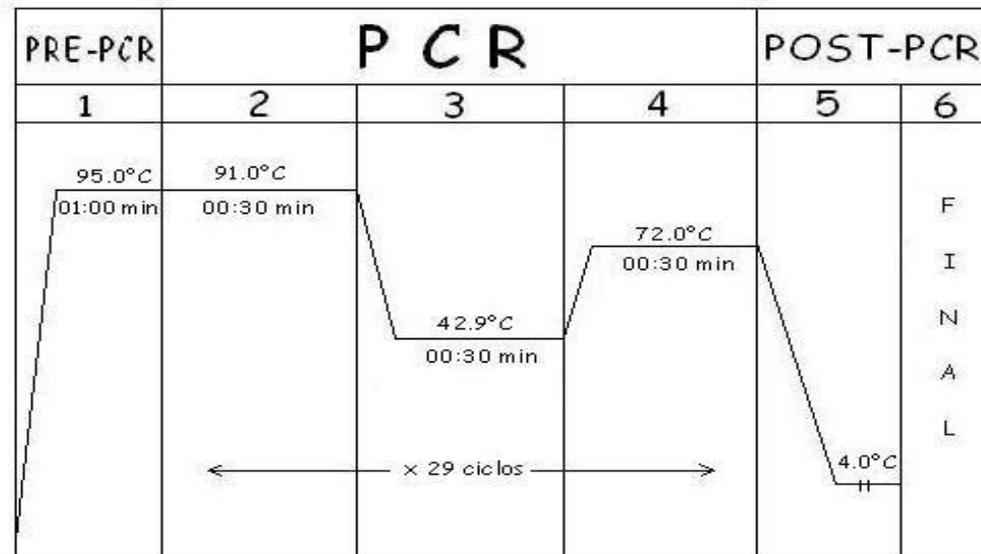
Anexo 04: Concentración de los reactivos para los primers DALP 01, DALP04 y DALP 08.

Reactivos	Con. Inicial	Con. Final	Cantidad
Buffer	5X	1X	4,00ul
Mg Cl ₂	25mM	5,63mM	4,51ul
DALP (selectivo)	10uM	0,8uM	1,60ul
DALP (reverso)	10uM	0,8uM	1,60ul
dNTP's	10mM	0,3mM	0,60ul
Taq	5u/ul	0,078u/ul	0,312ul
PRE MIX TOTAL			12,62ul
ADN 100ng/ul			6,00
Agua mili-Q			1,38
TOTAL			20ul

Anexo 05: Amplificación del ADN (DALP) vía PCR.



Anexo06: Perfil de temperatura para la reacción de PCR



Anexo 07: Electroforesis del ADN extraído y de los productos amplificados vía PCR



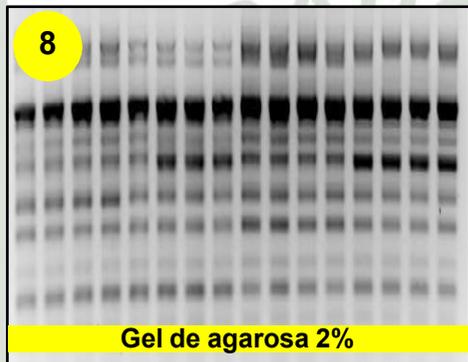
1
Preparación de la cuba



2
Preparación del gel de agarosa 2%



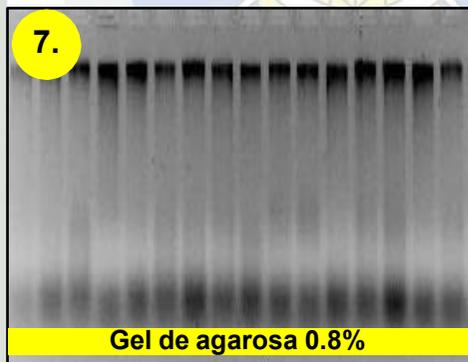
3
Gelificación



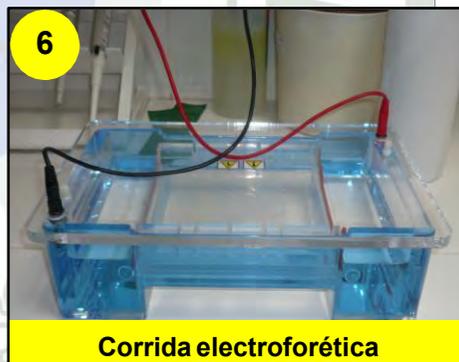
8
Gel de agarosa 2%



4
Acondicionamiento en la cuba



7.
Gel de agarosa 0.8%



6
Corrida electroforética



5
Siembra de: ADN ó Productos

Anexo 08: Preparación del gel de poliacrilamida al 6%

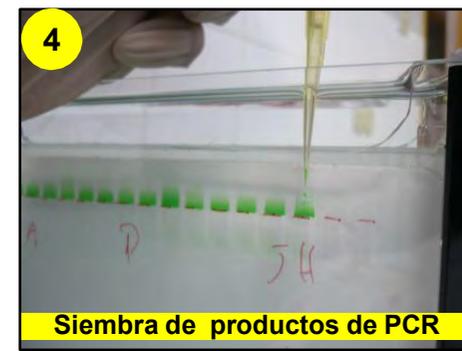
Reactivo	Conc. Inicial	Conc. Final	Vol. Gel 2 ^b
Agua MQ	--	--	34.3 ml
Buffer TBE	10X	1X	5.0 ml
Poliacrilamida*	30%	6%	10.0 ml
APS**	10%	--	656 μ l
TEMED	100%	--	47 μ l
TOTAL DE GEL			50 ml

Tiempo de polimerización: 1 hora

Lavar los posos del gel con agua destilada (utilizando una jeringa) por tres veces.



Anexo 09: Electroforesis de los productos amplificados vía PCR-DALP y tinción del gel de poliacrilamida 6%.



Anexo 10: Tinción RABAT – Nitrato de Plata.

1. Sumergir el gel de poliacrilamida en alcohol medicinal al 30% durante 10 minutos. Realizar movimientos suaves.
2. Descartar el alcohol medicinal y hacer (01) lavado de 03 minutos con agua destilada. Realizar movimientos suaves.
3. Sumergir el gel en ácido nítrico al 1% durante 03 minutos. Realizar movimientos suaves.
4. Descartar el ácido nítrico y hacer (01) lavado de 03 minutos con agua destilada. Realizar movimientos suaves.
5. Sumergir el gel en nitrato de plata al 0.2% durante 02 minutos. Realizar movimientos suaves.
6. Descartar el nitrato de plata y hacer (03) lavados con agua destilada cada uno por espacio de 3 minutos. Realizar movimientos suaves.
7. Sumergir el gel en carbonato de sodio (30g/l) y formaldehído 0.08% en una relación 2:1. Realizar movimientos suaves.
8. Documentar los perfiles tomando varias fotografías del gel a medida que las bandas se intensifican.
9. Se preservara los geles en medio de 02 hojas de papel celofán previamente humedecido con aguay se lo colocara sobre un soporte de vidrio. Para dejarlo secar a temperatura ambiente.