

T
634.6
A82

00 652

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA AMAZONÍA PERUANA



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA DE FORMACIÓN PROFESIONAL DE CIENCIAS
BIOLÓGICAS

**Caracterización molecular de los morfotipos
de frutos de aguaje *Mauritia flexuosa* L. f.
(ARECACEAE) en la región Loreto**

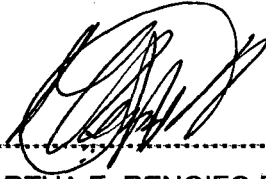
TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE
BIÓLOGO

PRESENTADO POR EL BACHILLER
FRANK PETER ASPAJO ARÉVALO

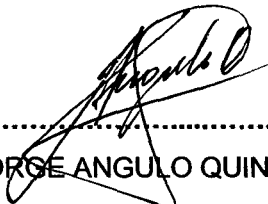
IQUITOS – PERÚ

2010

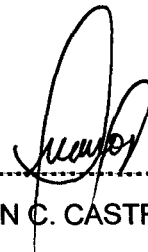
JURADO EXAMINADOR Y CALIFICADOR



Blga. MARTHA E. RENGIFO PINEDO Mgr.
PRESIDENTE



Blgo. JORGE ANGULO QUINTANILLA
MIEMBRO

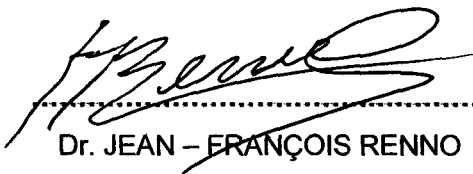


Blgo. JUAN C. CASTRO GÓMEZ MSc.
MIEMBRO

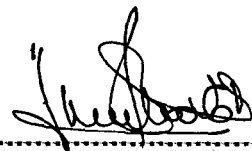
ASESORES



Dra. CARMEN ROSA GARCÍA DÁVILA



Dr. JEAN - FRANÇOIS RENNO



Blga. MILDRED M. GARCÍA DÁVILA Mgr.

DEDICATORIA

Muy especial a OSCAR ASPAJO, mi señor padre, por quien soy lo que soy. Gracias por tu sabiduría, fortaleza y optimismo; virtudes que me hacen sentir muy orgulloso de Ti. TE AMO VIEJO y se que desde donde estés me guiaras al éxito.

A mi madre ANGELA ARÉVALO, quien con amor y dedicación me brindó una formación integral de principios y valores que diariamente contribuyen a enriquecerme como ser humano y profesional.

A mis hermanos DALIA ARELI, OSCAR ROCK y CAMELIA DE FÁTIMA, quienes con apoyo y confianza plena me mantuvieron en la lucha por ser algo en la vida. A mis sobrinos ANGELA VALERIA ALMENDRA, OSCAR JOAQUÍN y ANGELLY CRISTINA, quienes con tiernas e inocentes sonrisitas me enseñan la alegría de la vida.

A mis mamitas CARMEN y ELVIRA, hoy pilares de mi familia.

AGRADECIMIENTO

- ❖ Al Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana – IIAP y al INCAGRO por la beca de estudios y financiamiento otorgado para la realización de la investigación.
- ❖ A la Dra. Carmen Rosa García Dávila, Jefe del Laboratorio de Biología y Genética Molecular y asesora en esta investigación; por sus enseñanzas, orientación y dedicación durante todo el proceso de ejecución de la tesis.
- ❖ Al Dr. Jean – François Renno, co asesor; por sus recomendaciones para el desarrollo de esta investigación.
- ❖ A la Blga. Mildred M. García Dávila, co asesora; por sus consejos y apoyo puesto de manifiesto antes y durante el desarrollo de este trabajo de investigación.
- ❖ Al Ing. Luis Freitas Alvarado, coordinador del proyecto; por las facilidades suministradas para la ejecución de esta investigación.
- ❖ Al Dr. Víctor Sotero Solís, por su amistad y los consejos impartidos para seguir en la senda de buscar el éxito profesional.
- ❖ A mis amigos, personas particularmente importantes y valiosas, gracias por la amistad incondicional y el apoyo brindado en todo momento. Agradecimiento especial a MCHLDTMV.
- ❖ A mis compañeros de trabajo del LBGGM, especialmente Ángel Martín, Fher, Jorge y Mike por el compañerismo, apoyo y colaboración brindada durante el desarrollo de la presente investigación.

ÍNDICE

	Pág.
JURADO EXAMINADOR Y CALIFICADOR	ii
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTO	iv
ÍNDICE GENERAL	v
ÍNDICE DE TABLAS	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
I. INTRODUCCIÓN	10
II. REVISIÓN DE LITERATURA	13
2.1. Sistemática y Biología de <i>Mauritia flexuosa</i> L. f.	13
2.1.1. Sistemática	13
2.1.2. Descripción morfológica	13
2.1.3. Distribución y Ecología	14
2.1.4. Variabilidad morfológica	17
2.1.5. Floración y Fructificación	17
2.1.6. Utilización	18
2.1.7. Valor nutritivo	19
2.1.8. Potencial Socio – Económico	19
2.2. Marcadores moleculares	20
2.3. Amplificación Directa de Polimorfismo de Longitud (DALP)	20
III. MATERIALES Y MÉTODOS	22
3.1. Materiales	22

3.2.	Métodos	25
3.2.1.	Lugar de ejecución	25
3.2.2.	Población y muestra	25
3.2.3.	Obtención del tejido foliar	27
3.2.4.	Extracción del ADN genómico – Método CTAB	27
3.2.5.	Amplificación Vía PCR – DALP	28
3.2.6.	Análisis de los datos	30
IV.	RESULTADOS	36
4.1.	Caracterización fenotípica – genotípica de los morfotipos	36
4.1.1.	Caracterización fenotípica de los morfotipos de frutos	36
4.1.2.	Caracterización molecular de los morfotipos de frutos	38
4.2.	Filogeografía entre tres poblaciones naturales de aguaje amarillo	43
V.	DISCUSIÓN	52
VI.	CONCLUSIONES	57
VII.	RECOMENDACIONES	58
VIII.	RESUMEN	59
IX.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60
X.	ANEXO	69

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 01. Georeferencias y número de muestras colectadas por poblaciones naturales en estudio	23
Tabla 02. Número y Secuencia de primers DALP utilizados en este estudio	25
Tabla 03. Escala de valores de F_{st} , según Hartl & Clark, 1997	28
Tabla 04. Diversidad morfológica de los frutos de aguaje <i>M. flexuosa</i> L. f. según morfotipos	32
Tabla 05. Diversidad genética de los morfotipos amarillo, color y shambo del aguaje <i>M. flexuosa</i> L. f. según el marcador DALP usado	33
Tabla 06. Perfiles genéticos de los morfotipos amarillo, color y shambo obtenidos con PCR – DALP	35
Tabla 07. Matriz del Estimador F_{st} para los morfotipos amarillo, color y shambo de aguaje <i>M. flexuosa</i> L. f.	37
Tabla 08. Diversidad genética del aguaje <i>M. flexuosa</i> L. f. del morfotipo amarillo según el marcador DALP06	37
Tabla 09. Perfiles genéticos para cada población natural de aguaje amarillo obtenidos con PCR – DALP	39
Tabla 10. Matriz del Estimador F_{st} para las tres poblaciones naturales de aguaje del morfotipo amarillo	41
Tabla 11. Matriz de distancias genéticas para las tres poblaciones naturales de aguaje del morfotipo amarillo	42
Tabla 12. Matriz de distancia genética y distancia geográfica de las tres poblaciones naturales de aguaje amarillo en estudio	43

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 01. Mapa de distribución geográfica de <i>Mauritia flexuosa</i> L. f. en el mundo	13
Figura 02. Mapa de distribución geográfica de <i>M. flexuosa</i> L. f. en la selva peruana	14
Figura 03. Mapa de ubicación geográfica de las poblaciones naturales en estudio: Quebrada Aucayo (río Amazonas)*, y la comunidad de Villa Jenaro Herrera (río Ucayali)* y la comunidad de Quebrada Parinari (río Marañón)*	23
Figura 04. Color de pulpa del fruto maduro de los morfotipos amarillo (A), color (B) y shambo (C)	31
Figura 05. Diferentes tamaños y formas de los morfotipos estudiados del aguaje <i>M. flexuosa</i> L. f.	32
Figura 06. Gel de poliacrilamida al 6% mostrando los fragmentos amplificados de ADN de los morfotipos amarillo, color y shambo de aguaje <i>M. flexuosa</i> L. f. usando DALP06	33
Figura 07. Gel de poliacrilamida al 6% mostrando los fragmentos amplificados de ADN de los morfotipos amarillo, color y shambo de aguaje <i>M. flexuosa</i> L. f. usando DALP07	34
Figura 08. Representación gráfica de los resultados de Análisis Factorial de Correspondencia y distribución sobre un plan factorial para	42

los ejes 1 (inercia 19.53 %), 2 (inercia 11,52 %) y 3 (inercia 8.01%) para los morfotipos amarillo (A), color (C) y shambo (S) de aguaje *M. flexuosa* L. f. en función a sus genotipos ...

Figura 09. Gel de poliacrilamida al 6% mostrando fragmentos amplificados de ADN de las poblaciones naturales de aguaje amarillo en estudio	38
Figura 10. Perfiles genéticos totales por cada población natural de aguaje amarillo, obtenidos con el marcador DALP06	40
Figura 11. Representación gráfica de los resultados del AFC y su distribución sobre un plan factorial para los ejes 1 (inercia 86.50%), 2 (inercia 13.50%) y 3 (inercia 0.00%) de tres poblaciones naturales de aguaje amarillo en función a sus genotipos	41
Figura 12. Dendrograma generado en base a la distancia genética de Reynolds (1983). Método UPGMA modificado del procedimiento NEIGHBOR de PHYLIP versión 3.5. El valor en el nudo indica su resultado de bootstrap	42
Figura 13. Representación gráfica de la correlación entre distancia genética y distancia geográfica de las tres poblaciones naturales de aguaje amarillo	43
Figura 14. Dendrograma de similitud (UPGMA) generado en base a la distancia genética de Reynolds <i>et al.</i> , 1983 entre las tres poblaciones naturales de aguaje <i>M. flexuosa</i> L. f. del morfotipo amarillo	47

I. INTRODUCCIÓN

La Amazonía es el mayor bosque tropical que existe en el mundo, se extiende aproximadamente 6,059,000 km² e involucra países como Brasil (que posee más del 50%), Perú (13%), Colombia (10%), Bolivia, Ecuador, Venezuela, Surinam, Guyana y la Guyana francesa (que comparten los aproximadamente 27% restantes). Contiene más del 50% de las especies registradas hasta el momento (Uhl & Dransfield, 1987; Montes de Oca, 1997). En el Perú, la Amazonía abarca una superficie aproximada de 770,000 km², alberga una vasta riqueza de ecosistemas y especies; haciendo que sus bosques sean más ricos en diversidad de especies que cualquier otro bosque tropical del planeta (Gentry, 1993; Kalliola, 1993; Mejía, 1997).

En la región Loreto, la especie más representativa entre las palmeras es el aguaje *Mauritia flexuosa* L. f. (Linneo, 1781), considerada promisoria desde el punto de vista económico, ecológico y social. Es una especie de uso múltiple, altamente nutritiva para el hombre, con importancia primordial en las cadenas alimenticias de muchas especies de fauna silvestre (ungulados, monos y peces) y con un gran potencial económico en el área de servicios ambientales debido a que contribuye al secuestro de carbono ayudando a mitigar el cambio climático (Oré *et al.*, 1997; INRENA 2000; PRONATURALEZA, 2005; del Castillo *et al.*, 2006; Delgado *et al.*, 2007). Actualmente existe una sobreexplotación de este recurso; solamente en Iquitos, se consumen aproximadamente 20 t de frutos de aguaje al día. Esto sumado a la práctica de métodos destructivos (tala del árbol) en la colecta, ha originado una fuerte declinación de sus poblaciones naturales, con la consecuente erosión genética y ocasionando un fuerte impacto en la

economía de los pobladores que usan este recurso como fuente de ingresos (Coradin & Lleras, 1988; Mejía, 1997; Oré *et al.*, 1997; Penn, 1999; Bejarano & Piana, 2002; PRONATURALEZA, 2005).

Es conocido que la conservación y utilización de los recursos genéticos es de importancia estratégica para la humanidad. De hecho varias especies de importancia agrícola, agroindustrial, medicinal y farmacológica se han originado en las regiones amazónicas (Becerra & Paredes, 2000). El desorden en la explotación comercial de este recurso puede estar originado en gran proporción por la carencia de información científica sólida que sirva como base a los planes de manejo sostenido de las poblaciones de esta especie (Cavalcante, 1991; De Paula Fernandes, 2001). Hasta el momento la información registrada en la literatura reporta principalmente estudios sobre su biología, ecología y agroforestería (Balick, 1979; Storti, 1993; Mejía, 1997; Oré *et al.*, 1997; Penn, 1999; Bejarano & Piana, 2002; PRONATURALEZA, 2005; del Castillo *et al.*, 2006; Delgado *et al.*, 2007). Existe escasa información sobre estudios moleculares en esta especie y estos están referidos principalmente a establecer las relaciones filogenéticas del aguaje dentro de la familia Arecaceae (Pintaud *et al.*, 2007) y a la búsqueda de identificación de sexos (Rengifo, 2008).

Es en ese sentido, que el presente trabajo de investigación pretende generar información sobre la caracterización molecular de frutos de aguaje y la variabilidad genética del aguaje en poblaciones naturales, utilizando como herramienta de diagnóstico molecular el marcador DALP (Amplificación Directa de Polimorfismo de Longitud), técnica de bajo costo que ha sido utilizado exitosamente para establecer diferencias genéticas entre varias especies de plantas.

OBJETIVOS

General

- Caracterizar molecularmente los morfotipos de frutos de *Mauritia flexuosa* L. f. y determinar la variabilidad genética entre las poblaciones de aguaje amarillo, mediante análisis molecular.

Específicos

- Establecer la relación entre variación fenotípica y genotípica de los frutos del aguaje *Mauritia flexuosa* L. f. mediante marcador DALP
- Establecer las relaciones filogeográficas entre tres poblaciones naturales de aguaje amarillo en diferentes comunidades de la región Loreto, mediante marcador DALP
- Estimar el índice de fijación – F_{st} para explicar el grado de diferenciación entre las poblaciones estudiadas de aguaje amarillo.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. SISTEMÁTICA Y BIOLOGÍA DE *Mauritia flexuosa* L. f.

2.1.1. Sistemática

Según Carlos Linneo (1782), el aguaje se clasifica en:

Reino	:	Plantae
División	:	Magnoliophyta
Clase	:	Liliopsida
Orden	:	Arecales
Familia	:	Arecaceae
Sub Familia	:	Calamoidae
Tribu	:	Lepidocaryeae
Género	:	<i>Mauritia</i>
Especie	:	<i>Mauritia flexuosa</i> L. f.

2.1.2. Descripción morfológica

El aguaje es una palmera arborescente dioica, posee estípites solitarios, no tiene espinas, es de color café claro. Alcanza entre 35 a 40 m de altura y de 30 a 60 cm de diámetro. Es de vida gregaria (aguajales) o solitaria. Presenta raíces primarias originadas en la base del tallo y en la parte superior de estas así como raíces secundarias. Las hojas son compuestas, tienen hasta 6 m de longitud, están agrupadas (hasta 25 hojas) en la parte terminal del tallo, poseen raquis de 2,5 m de longitud y pecíolo cilíndrico. Las inflorescencias masculinas y femeninas son interfoliales, similares en forma y tamaño, de 2 a 3 m de longitud. El pedúnculo de la inflorescencia

mede entre 60 y 100 cm, mientras que el raquis entre 70 y 140 cm. Cada inflorescencia posee un promedio de 20 a 45 raquis secundarios dispuestos opuestamente. Las flores son dispuestas en espigas y alternadamente en las raquillas. El fruto es una drupa globosa, ovoidea o elíptica, de 5 a 7 cm de longitud y 4 a 5 cm de diámetro, 40 a 85 g de peso. Posee epicarpio de escamas lisas y romboideas, de color pardo a rojo vino o rojo oscuro; mesocarpio o pulpa (parte comestible) de 4 a 6 mm de espesor, suave, agridulce, de color amarillo – anaranjado o anaranjado; y endocarpio (cobertura de la semilla) de color blanco, suave y rico en celulosa. La semilla es una por fruto (muy raramente dos semillas por fruto), casi esférica, subglobosa y sólida (Cavalcante, 1991; Galeano, 1991; Kahn et al., 1993; Henderson, 1995; Villachica, 1996; Hiraoka, 1999; del Castillo et al., 2006; Delgado et al., 2007).

2.1.3. Distribución y ecología

El aguaje es una palmera restringida a América del sur y se distribuye desde el Norte (cuenca del Orinoco, las Guayanas, Venezuela, Trinidad y Tobago) hasta el Sur (Cerrado brasileño, llegando a Mato Grosso del Sur, Minas Gerais, Goiás y São Paulo); por el Este en el litoral brasileño; y por el Oeste en los valles del piedemonte andino en Bolivia, Colombia, Ecuador y Perú (Uhl & Dransfield, 1987; Henderson, 1995; Villachica, 1996; del Castillo *et al.*, 2006).

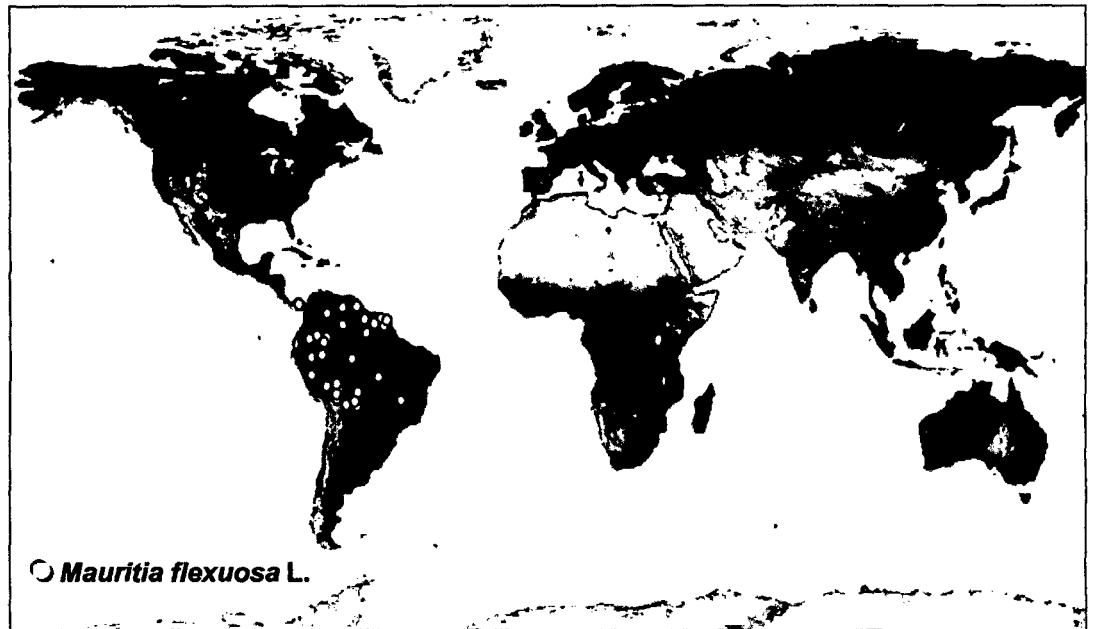


Figura 01. Mapa de distribución geográfica de *Mauritia flexuosa* L. f. en el mundo

En la selva peruana, se cultiva y explotan poblaciones naturales en los departamentos de Loreto, Ucayali, Huanuco y San Martín, probablemente estas poblaciones sean originarias de las cuencas de los ríos Huallaga, Ucayali y Marañón. La alta concentración de poblaciones casi monoespecíficas presentes en la Depresión Ucamara (área de influencia de los ríos Ucayali y Marañón) sugiere que el centro de diversidad del aguaje podría estar en la Amazonía peruana (Villachica, 1996).

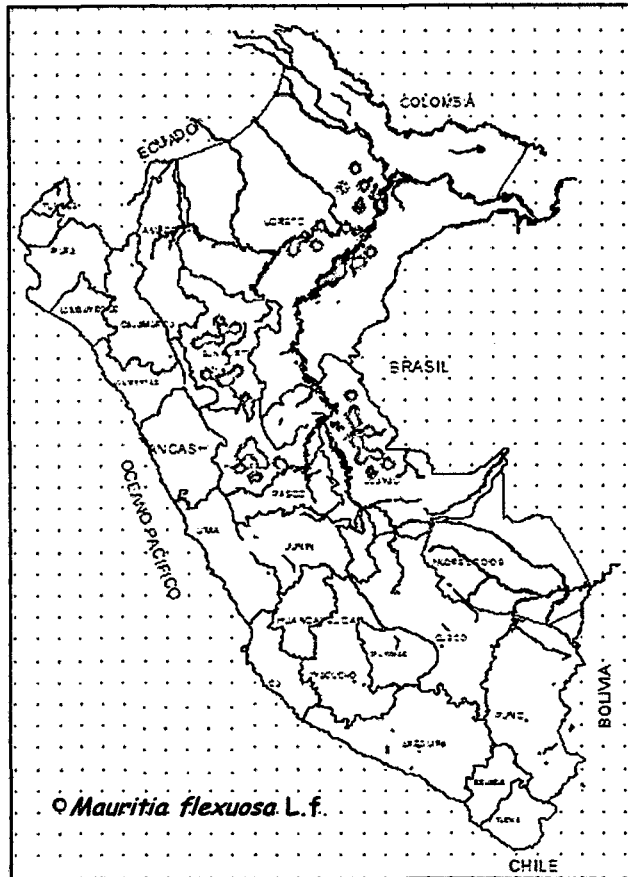


Figura 02. Mapa de distribución geográfica de *Mauritia flexuosa* L. f. en la selva peruana

El hábitat natural del aguaje está formado por humedales o pantanos y zonas con suelos temporal o permanentemente inundados denominados "aguajales" (en la amazonía peruana son de 6 a 8 millones de hectáreas). Aunque esta especie también prospera en terrenos no inundables con buen drenaje o drenaje deficiente, soportando inundaciones permanentes de su sistema radicular (Villachica, 1996; Delgado *et al.*, 2007).

2.1.4. Variabilidad morfológica

El aguaje presenta una gran variabilidad morfológica, en cuanto al aspecto de la planta en general Villachica en 1996 reportó cuatro tipos: a) “*el común*” (presenta hojas terminales con los foliolos erectos y hojas antiguas con foliolos del cuarto superior inclinadas), b) “*el triste llorón*” (tiene todos los foliolos de las hojas totalmente inclinadas), c) “*el cashacusho o quintisho*” (tiene todos los foliolos de las hojas totalmente erectas) y d) el “*dístico*” (con hojas a derecha e izquierda). Con respecto al color de los frutos Villachica en 1996 distingue cuatro tipos: a) “amarillo o ponguete” (mesocarpio de color amarillo), b) “color” (parte externa del mesocarpio es rojo – anaranjado y el resto amarillo), c) “shambo” (mesocarpio rojo) y d) “shambo azul” (en realidad son sólo frutos casi maduros).

2.1.5. Floración y fructificación

La floración y la fructificación del aguaje se distribuye irregularmente durante el año, pero siempre ocurren anualmente (Villachica, 1996). El número de inflorescencias por palmera varía de 5 a 8, siendo que el periodo de formación de una inflorescencia masculina hasta la producción de flores es de 2 a 3 meses y el de una inflorescencia femenina, es aproximadamente 2 meses (Cavalcante, 1991; Storti, 1993).

La fructificación inicia aproximadamente a los ocho años, con plantas que alcanzan una altura de hasta 7 m y se observa mayores concentraciones entre febrero – agosto y relativa escasez de setiembre – noviembre (Padoch, 1988; Cavalcante, 1991; Villachica, 1996). En el Perú y la

Amazonía norte de Brasil abundan los frutos en la primera mitad del año; mientras que en Colombia, Venezuela y la Amazonía central de Brasil en la segunda mitad del año (Galeano, 1991; Villachica, 1996). El aguaje presenta una fructificación continua durante muchos años y decrece a partir de los 40 a 50 años (PRONATURALEZA, 2005). Una inflorescencia produce de 700 a 900 frutos y entre 290 – 320 kg frutos/palmera (Villachica, 1996; del Castillo *et al.*, 2006; Delgado *et al.*, 2007).

2.1.6. Utilización

Todas las partes de la planta son aprovechadas. Se consume la pulpa de la fruta de manera directa o en forma de helados, chupetes, mermeladas o refrescos. El tallo se utiliza ocasionalmente como pisos de viviendas rústicas, puente o como criadero de larvas comestibles de coleópteros conocidos como “suris” *Rhynchoporus palmarum*. Las hojas se emplean para confeccionar techos de viviendas rústicas, esteras, sombreros, canastas, cestos de pescar, cuerdas y hamacas. Del pecíolo se obtiene pulpa para papel y su médula puede ser usada como corcho o tapón para botellas de licor, juguetes hechos a mano o relleno para sillas y camas. Las semillas sirven también para fabricar artesanías. Asimismo, las inflorescencias jóvenes se cortan para obtener savia dulce, que puede ser consumida directamente, fermentada para obtener una bebida alcohólica o hervida para obtener azúcar. Del meristemo terminal se obtiene el palmito que es comestible (Villachica, 1996; del Castillo *et al.*, 2006).

En Venezuela, las poblaciones indígenas usan la masa seca como pan; en Ecuador, el aguaje juega un importante papel en la alimentación de las

poblaciones nativas, y en Brasil, la mayor fuente alimenticia durante la época de inundaciones para las poblaciones ribereñas del Estado do Pará, se apoya en el aguaje (Vickers, 1976; Hiraoka, 1999).

2.1.7. Valor nutritivo

La pulpa de aguaje es altamente nutritiva y contiene proteínas, grasas, carbohidratos y vitaminas que cuidan nuestros ojos, piel y cabello. En 100 g de muestra se encuentra de 173 a 300 mg de vitamina A (en dulces, postres, etc. es alternativa contra la hipovitaminosis A), de 80 a 100 mg de vitamina E y de 50 a 60 mg de vitamina C. Puede ser una fuente potencial de aceites comestibles, el mesocarpio contiene 29% de aceite (peso seco), principalmente compuesto por ácido oléico (78,3%) y palmítico (18,1%). El aceite posee elevados tenores de pro – vitamina A (500 UI/g) en forma de β – caroteno (brinda el color característico rojo – anaranjado – amarillo la pulpa). La semilla molida puede ser usada como alimento de ganado (Villachica, 1996).

2.1.8. Potencial socio – económico

Sin duda, el aguaje es la fruta más importante en el mercado urbano de la Amazonía baja, donde su demanda de consumo no es satisfecha en gran parte del año y proporciona, además, ingresos a un sector importante de la población, particularmente mujeres. Solo en Iquitos, miles de familias están relacionadas con la comercialización de este fruto (del Castillo *et. al.*, 2006) y muchas otras más con su consumo diario, alrededor de 20 t/día (Villachica, 1996).

2.2. Marcadores moleculares

Cualquier fenotipo molecular oriundo de un gen expreso (como en el caso de las isoenzimas) o de un segmento específico de ADN correspondiente a una región expresa o no del genoma (Ferreira & Grattapaglia, 1998). Estos pueden ser utilizados tanto en estudios básicos de genética como en la práctica del mejoramiento, son aplicables a cualquier tipo de material vegetal, independientes de la época del año en que se realiza el análisis y en especies cultivadas o silvestres (Tanksley, 1983; Powell, 1992; Phillips *et al.*, 1995; Rallo *et al.*, 2002; Azofeifa – Delgado, 2006). Actualmente los marcadores moleculares han sido utilizados con éxito para el estudio de la variabilidad genética y el mejoramiento de diversas especies de plantas anuales (Brondani *et al.*, 1998) como: “soya” *Glycine max* (Akkaya *et al.*, 1992), “arroz” *Oryza sativa* (Wu & Tanksley, 1993), “maíz” *Zea mays* (Senior & Heum, 1995), “cebada” *Hordeum vulgare* (Becker & Heum, 1995), “trigo” *Triticum aestivum* (Röder *et al.*, 1995), “tabaco” *Nicotiana tabacum* y otros (Bornet & Branchard, 2001).

2.3. Amplificación Directa de Polimorfismo de Longitud – DALP

Este método realiza un barrido o screen del genoma de cualquier especie usando primers (cebadores) arbitrarios (AP – PCR). Cada experimento requiere de un primer reverso (fijo) que puede ser utilizado en combinación con cualquiera de los ocho primers selectivos, produciendo un patrón específico de bandas múltiples.

Todos los fragmentos generados pueden ser secuenciados por los dos primers M13 (-40USP: GTTTTCCCAGRCACGAC y DALPR: TTTCACACAGGAAACAGCTATGAC) de re-amplificación y secuenciamiento universal: U.S.P (Hoarau & Borsa, 2000; Desmarais *et al.*, 1998).

Esta técnica permite estudios genéticos de poblaciones así como el mapeo temprano de los marcadores o selección de loci asociados con rasgos o enfermedades (Desmarais *et al.*, 1998). Usa marcadores co – dominantes, aísla solo sitios polimórficos, usa un número ilimitado de marcadores y, lo mas importante, no requiere información genética previa (Perrot – Minnot *et al.*, 2000).

Ha sido utilizado exitosamente para establecer las diferencias genéticas entre especies de plantas como *Panax ginseng* y *P. quinquefolius* (HA *et al.*, 2001) así como en poblaciones naturales de *Stephania yunnanensis* (Yun – shu, *et al.*, 2008). También a sido utilizado exitosamente en diferentes especies de animales como ratones *Mus musculus musculus* y *M. musculus domesticus*, peces como tilapia *Oreochromis niloticus* y *Sarotherodon melanotheron*, aves *Larus cachinnans* y *L. audouinii*, mejillones *Mytilus galloprovincialis* y *M. edulis*, y un ácaro *Amblyseius californicus* (Desmarais *et al.*, 1998), obteniéndose resultados exitosos a nivel intra e interpoblacional.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Materiales

3.1.1. Material biológico

- Muestras de frutos y de hojas adultas de cada uno de los morfotipos (según la coloración del fruto: amarillo, color y shambo) de *Mauritia flexuosa* L. f.

3.1.2. Materiales de vidrio

- Frascos con tapa de 1000 ml
- Matraz de Erlenmeyer 250, 500 y 1000 ml
- Probetas graduadas de 100, 500 y 1000 ml
- Vaso de precipitado de 250 y 500 ml
- Termómetro de 100°C
- Cassettes para geles de poliacrilamida

3.1.3. Materiales de plástico

- Cooler pequeño
- Cubetas para geles de agarosa
- Flotadores para microtubos
- Gradillas para microtubos de 0.5, 1.5 y 2 ml
- Micropipetas de 2.5, 10, 20, 100, 200 y 1000 μ l
- Microtubos de 0.5, 1.5 y 2 ml
- Peines para geles de agarosa y poliacrilamida
- Pilonos, plastifilm y recipientes de descarte
- Tips de 10, 100, 200 y 1000 μ l
- Tubos tipo falcon de 50 ml

3.1.4. Equipos

- Balanza analítica (Mod. Extend ED2245 – Sartorius)
- Baño María (Mod. 1228-2 – VWR)
- Cámara de flujo laminar (mod. - LABCONCO)
- Cámara fotográfica (mod. Lumix DMC FZ18 - Panasonic)
- Centrífuga (mod. Centrifuge 5804R – Eppendorf)
- Espectrofotómetro (mod. Genesis 10Uv – Thermo Spectronic)
- Potenciómetro (mod. WTW Ph 720 – INOLAB)
- Refrigeradora (mod. Intelligent Freezer 32 – Bosch)
- Termociclador (mod. My Cyclor - Eppendorf)
- Transluminador de Luz ultravioleta (mod. Gel Logie 100 - KODAK)

3.1.5. Reactivos y Soluciones

- 2 – Mercaptoetanol
- Ácido bórico y nítrico
- Agarosa, Acrilamida y Bisacrilamida
- Agua milli – Q (ultrapura)
- Azul Bromofenol y Bromuro de Etidio
- Carbonato de sodio
- Cloroformo y Alcohol al 70 y 96 %
- Cloruro de Magnesio (MgCl₂)
- Cloruro de Sodio (NaCl)
- CTAB (Hexadeciltrimetilamonibromuro)
- EDTA (acidoetilenodiaminotetraacético)
- Etanol absoluto e Isopropanol

- Formaldeído al 37%
- Hidróxido de Sodio
- Kit de desoxirribonucleótidos trifosfatos (dNTP's)
- Marcador de peso molecular conocido
- Nitrato de plata
- Persulfato de amonio (APS)
- Primers DALP06 y DALP07
- Proteinasa K
- Taq DNA Polimerasa (*Thermus aquaticus*)
- TEMED (Tetrametiletilendiamino)
- Trizma Base (Tris hidroximetil aminometano)

3.1.6. Otros

- Bolsas plásticas
- Calculadora
- Cuaderno de apuntes
- Espátulas y pinzas
- Guantes estériles quirúrgicos
- Lapiceros y plumón marcador
- Papeles aluminio, filtro y secante
- Parafilm
- Tapers
- Tubos de plástico con tapa de 50 ml
- Vaselina pura

3.2. Métodos

3.2.1. Lugar de ejecución

El presente trabajo de investigación se ejecutó durante 14 meses comprendidos desde Setiembre del 2007 hasta Octubre del 2008, en las instalaciones del Laboratorio de Biología y Genética molecular (LBGM) del Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana (IIAP) – Estación Quistococha, ubicada al margen derecho de la carretera Iquitos – Nauta en el Km. 4,5 del distrito de San Juan Bautista, provincia de Maynas, departamento de Loreto, Perú.

3.2.2. Población y muestra

La población en estudio fue constituida por los aguajales naturales ubicados en: a) comunidad Quebrada Parinari (río Marañón), b) comunidad Quebrada Aucayo (río Amazonas) y c) comunidad Villa Jenaro Herrera (río Ucayali), ver localización geográfica en Fig. 03 y coordenadas en Tab. 01. Las plantas fueron seleccionadas previa prospección de los individuos y mediante un muestreo aleatorio simple por observación directa.

Colecta de frutos: Se seleccionaron 10 plantas por cada morfotipo perfectamente identificados, de cada planta se colectaron 30 frutos y se conservaron en bolsas plásticas para su posterior análisis morfológico en el laboratorio.

Colecta de tejido foliar: Se colectaron en total 50 muestras de tejido foliar de palmeras adultas (Tab. 01). Para el estudio de caracterización genética de los morfotipos de frutos fueron utilizadas 30 muestras (10 por

cada morfotipo amarillo, color y shambo) provenientes de la población de Aucayo. Para el estudio de variabilidad genética poblacional de aguaje amarillo se utilizaron 20 muestras provenientes de poblaciones naturales de Jenaro Herrera y Parinari (10 por cada población), que junto a las 10 muestras ya obtenidas de la población de Aucayo suman un total de 30 muestras.

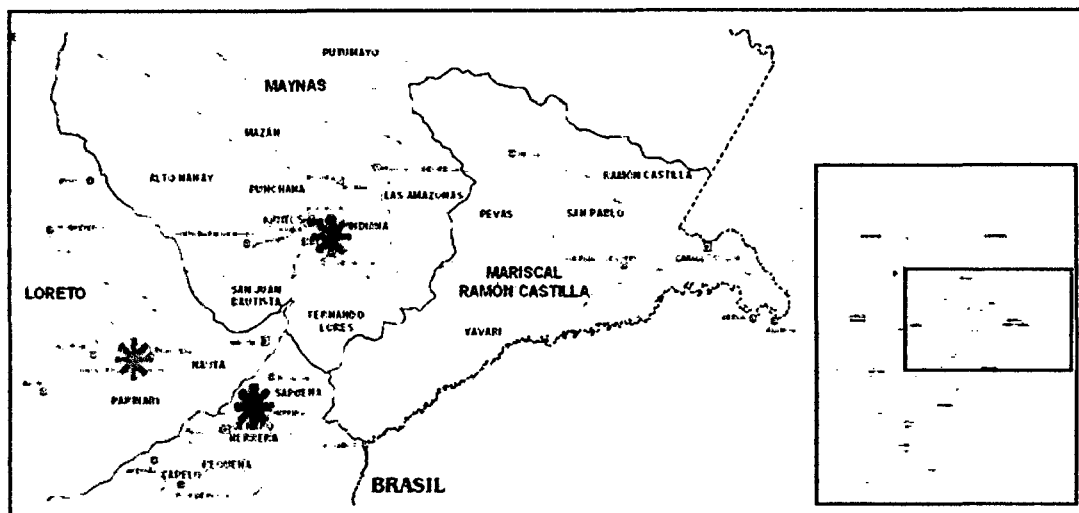


Figura 03. Mapa de ubicación geográfica de las poblaciones naturales en estudio Quebrada Aucayo (río Amazonas)*, comunidad Villa Jenaro Herrera (río Ucayali)* y comunidad de Quebrada Parinari (río Marañón)*

Tabla 01. Georeferencias y número de muestras colectadas por poblaciones naturales en estudio

POBLACIONES	COORDENADAS		Morfotipo	# muestras (tejido foliar)	# Frutos
	E	N			
Aucayo	UTM 9574726	18M 707998	Amarillo	10	30
			Color	10	30
			Shambo	10	30
Jenaro Herrera	UTM 9457318	18M 647688	Amarillo	10	-
Parinari	UTM 9490154	18M 556280	Amarillo	10	-
Total				50	90

Fuente: Cuaderno de apuntes

3.2.3. Obtención de tejido foliar

Con la ayuda de tijeras esterilizadas en alcohol fueron colectados pequeños trozos de tejido foliar, estas muestras fueron luego colocadas individualmente en sobres de papel aluminio y depositadas dentro de tubos tipo falcón de 50 ml a las que se añadieron preservantes sintéticos (piedras secantes) para evitar su deshidratación y oxidación. Finalmente, estos fueron guardados en un cooler pequeño para su traslado y posterior análisis en el Laboratorio (anexo 01).

3.2.4. Extracción del ADN genómico – Método CTAB

El ADN genómico fue obtenido a partir de la extracción del tejido foliar de *Mauritia flexuosa* L. f (anexo 02) y mediante la aplicación del método de extracción CTAB de Doyle & Doyle, 1987; con el siguiente protocolo:

1. Mezclar 100 mg de la muestra (tejido foliar triturado) en 1000 µl de buffer de extracción CTAB (CTAB 2%, NaCl 1 M, EDTA 0.1 M pH 8, Tris Base 0.2 M), añadir 10 µl Proteinasa K (0.1 mg/ml) y macerar en baño María a 60°C durante 24 horas.
2. Separar el material genómico añadiendo 1ml de cloroformo y centrifugando a 8 000 rpm durante 5 min.
3. Precipitar el material genómico poniendo 500 µl de sobrenadante en 750 µl de isopropanol frío al 70%, se dejó a -20°C durante 2 horas, centrifugar a 13 000 rpm durante 15 min.
4. Lavar el ADN total añadiendo 750 µl de etanol absoluto (dos veces). El pellet resultante poner a secar durante 4 horas para finalmente resuspender en 30 µl de agua ultrapura.

3.2.4.1. Cuantificación por espectrofotometría

Se evaluó la pureza y concentración aproximada del ADN extraído mediante el método espectrofotométrico de Maniatis, 1989 (anexo 03), utilizando un espectrofotómetro UV/Visible. La absorbancia se midió utilizando las longitudes de ondas de 260 y 280 nm. La evaluación de la calidad en pureza de la extracción se realizó considerando un rango aceptable entre 1.7 – 2.2 (A_{260}/A_{280}) y la concentración del ADN extraído se determinó multiplicando: $[A_{260} \times \text{Factor de Dilución} \times 50 \mu\text{g}/\mu\text{l}]$.

3.2.4.2. Cualificación por electroforesis

La verificación de la calidad de la extracción se realizó mediante la observación de las bandas de ADN en geles de agarosa 0,8% teñido con bromuro de etidio (10 mg/ml) a razón de 1 $\mu\text{l}/50\text{ml}$. La migración se realizó en una cámara electroforética horizontal a 100 V por espacio de 30 minutos. Los resultados obtenidos fueron visualizados en un transluminador UV y los geles fueron fotodocumentados en un sistema de imagen GEL LOGIE 100, KODAK con la finalidad de tener un registro de las corridas electroforéticas (anexo 04).

3.2.5. Amplificación vía PCR – DALP

Se utilizaron ocho primers selectivos y un solo primer reverso (primer fijo) propuestos por Desmarais *et al.*, 1998. Estos se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 02. Número y Secuencia de primers DALP utilizados en este estudio

Primer Reverso	DALP R	TTTCACACAGGAAACAGCTATGAC
Primers Selectivos DALP 2Xj	DALP 221 (DALP 01)	GTTTTCCCAGTCACGACGC
	DALP 231 (DALP 02)	GTTTTCCCAGTCACGACAGC
	DALP 232 (DALP 03)	GTTTTCCCAGTCACGACGAC
	DALP 233 (DALP 04)	GTTTTCCCAGTCACGACACG
	DALP 234 (DALP 05)	GTTTTCCCAGTCACGACCAG
	DALP 235 (DALP 06)	GTTTTCCCAGTCACGACCAC
	DALP 241 (DALP 07)	GTTTTCCCAGTCACGACTCAG
	DALP 242 (DALP 08)	GTTTTCCCAGTCACGACCTAG

La reacción en cadena de la polimerasa – PCR se llevó a cabo con un volumen final de 25 µl, conteniendo 2 µl ADN molde (100 ng/µl), 0,375 µl de Taq polimerasa (5 U/µl), 5µl Buffer (5X), 0,75 µl dNTPs (10 mM), 3,1 µl MgCl₂ (25 mM), 2 µl de cada primer (10 mM) y agua ultrapura; y a temperaturas optimas de hibridación (alineamiento) de 51°C (DALP06) y 45.7°C (DALP07). Las condiciones de optimización y el perfil de temperaturas de cada uno de ellos se muestran en el anexo 05 (DALP06) y anexo 06 (DALP07).

3.2.5.1. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR – DALP

Se preparó geles de agarosa al 2% teñidos con bromuro de etidio (1 µl/ 50 ml de gel). Los geles fueron cargados con 3 µl de muestra (mix de reactivos mas ADN), un marcador de peso molecular conocido (Marker 1kb DNA Ladder) y corridos en un campo eléctrico horizontal a 100 V durante 2 horas sumergidos en buffer TBE 1X. Los resultados obtenidos fueron visualizados en luz UV y finalmente fotodocumentados (anexo 04).

3.2.5.2. Electroforesis en gel de poliacrilamida

Una vez confirmada el éxito de la amplificación de los fragmentos de ADN en agarosa, los productos de PCR fueron corridos en geles de poliacrilamida al 6% (anexo 07 y 08). Los geles fueron cargados con 15 µl de muestra, un marcador de peso molecular conocido y corridos en un campo eléctrico vertical (300 V, 100 mA, 100 W) durante 4 horas en buffer TBE 1X. Posteriormente los geles fueron sometidos a la Tinción Rabat - Nitrato de Plata (anexo 09). Las bandas visualizadas varios minutos después fueron fotodocumentados con una cámara digital.

3.2.6. Análisis de datos

3.2.6.1. Análisis Factorial de Correspondencia – AFC

El análisis Factorial de Correspondencia – AFC, es un tipo de análisis canónico particularmente bien adaptado para describir las asociaciones, comportamientos o tendencias de un conjunto de individuos identificados como una serie de variables o descriptores (análisis de una tabla de contingencia creciente de las modalidades de dos variables). El objetivo principal es generar una representación gráfica de todos los individuos en un espacio de un número menor de dimensiones que las n variables que se midieron (en general dos o tres). Los individuos, las variables o ambos simultáneamente, son representados en planos de dos o tres dimensiones en función de sus proximidades. El AFC realiza una matriz de perfiles de 100 a 500 para el tratamiento de datos en el Software Genetix versión 4.05.2 (Belkhir et al., 2004).

En este trabajo se realizó dos análisis factoriales de correspondencia, el primero para determinar la diferencia genética existente entre los tres morfotipos de frutos: amarillo, color y shambo del aguaje *Mauritia flexuosa* L. f., y el segundo para visualizar las diferencias entre las poblaciones naturales de aguaje amarillo de Aucayo, Jenaro y Parinari. Para ello se evaluó la presencia o ausencia de bandas en fragmentos polimórficos (bandas informativas).

3.2.6.2. Relaciones interpopulacionales

Se utilizó el Método de Parsimonia de Wagner (Eck & Dayhoff, 1966 y Kluge & Farris, 1969), que permite visualizar las relaciones de los individuos pertenecientes a las poblaciones naturales de aguaje amarillo de Aucayo, Jenaro Herrera y Parinari. El criterio del método fue elaborar y encontrar un árbol que requiere el número mínimo de cambios. Este se realizó con los programas Seqboot, Mix y Consense del paquete de inferencia filogenética PHYLIP versión 3.5c (Felsenstein, 1993) y visualizado en el programa TREVIEW (Page, 1996).

3.2.6.3. Diferenciación entre poblaciones

Denominado también Índice de Fijación (F_{st}). Este tipo de análisis estadístico sirve para estimar medidas de las diferencias genéticas que existen o no entre poblaciones. Los valores del F_{st} varían entre 0 y 1. Cuando el F_{st} es igual a cero (0) no hay diferenciación genética (las poblaciones se comportan como una sola población), pero cuando el F_{st} es igual a uno (1), la estructuración (diferenciación) es total.

Para considerar significativo un valor de F_{st} se compara éste con 1000 estimadores de F_{st} obtenidos de situaciones donde no existe estructuración, eliminando la hipotética estructuración real por las permutaciones de los individuos en el conjunto de las poblaciones (Weir & Cockerham, 1984; Weir, 1990).

El grado de diferenciación entre las poblaciones estudiadas se estimó con la ayuda del Software Genetix versión 4.05.2 (2004), utilizando el estimador de Weir & Cockerham (1984) y Weir (1990):

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

Donde:

A_i = Componente de la variación de los perfiles entre los grupos.

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

$C_i = 0$

Tabla 03. Escala de valores de F_{st} , según 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 el presente estudio 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 4.05.1 (Belkhir *et al.*, 2004).

En este estudio se realizó dos análisis de Índice de fijación, el primero para determinar la diferencia genética existente entre los tres morfotipos de frutos del aguaje *Mauritia flexuosa* L. f., para ello se evaluó la presencia o ausencia de las bandas que presenten fragmentos polimórficos (bandas informativas); y el segundo para visualizar las diferencias entre las poblaciones naturales de aguaje amarillo.

3.2.6.4. Distancia genética

Las relaciones entre las poblaciones naturales de aguaje amarillo fueron estimadas en base a las distancias genéticas calculadas con la fórmula de Reynolds *et al.*, 1983 mediante el software Genetix versión 4.05.2 (Belkhir. *et al.*, 2004).

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

Donde:

D = Distancia genética

LN = Logaritmo Neperiano

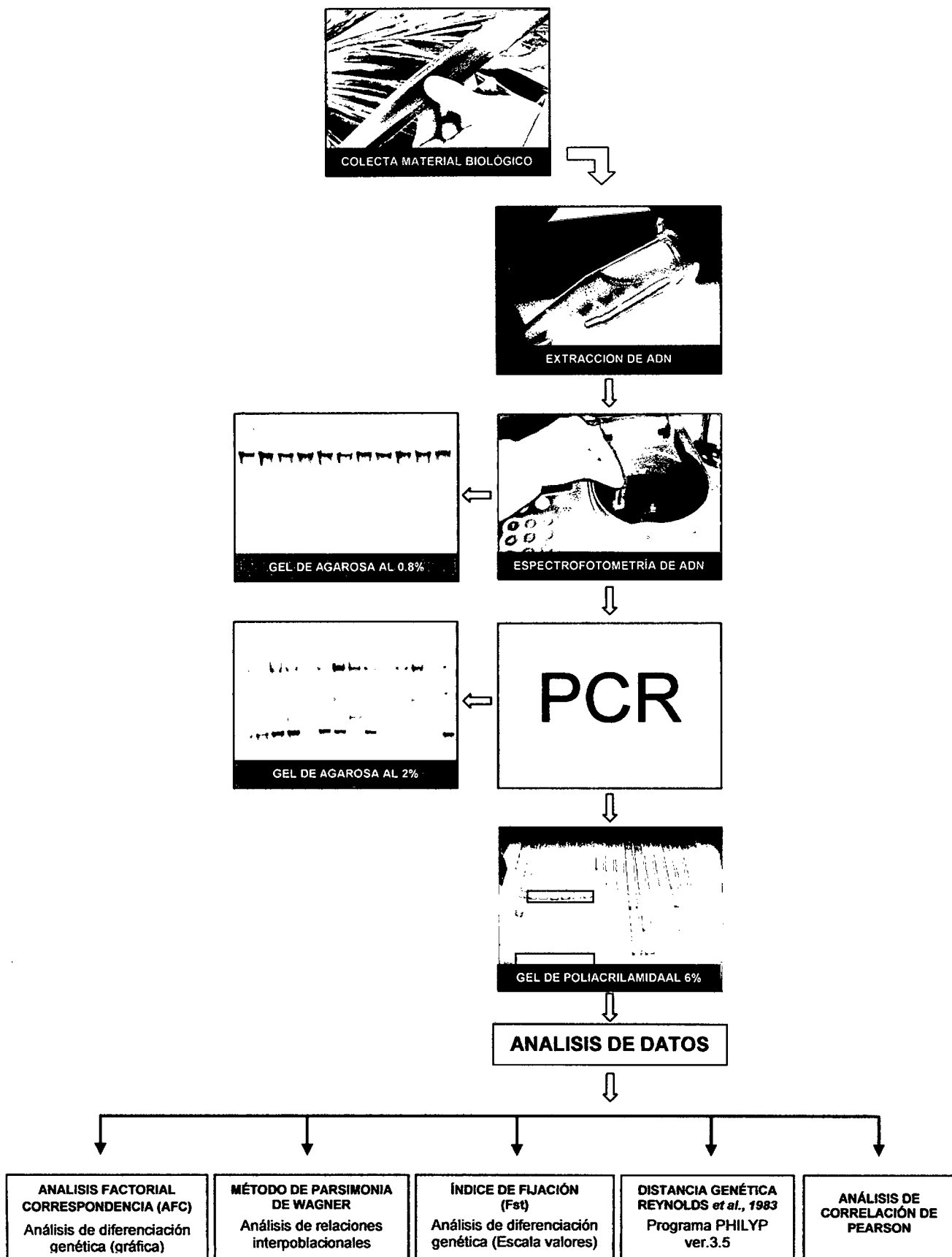
Fst = Medida de la estructuración entre las poblaciones analizadas

A partir de la distancia genética obtenida se procedió a la agrupación de las poblaciones por el método UPGMA (Unweighted Pair Group Method with the Arithmetic Averaging) utilizando el programa PHYLIP versión 3.5c (Felsenstein, 1993), generando un dendrograma que fue visualizado en el programa TREVIEW (Page, 1996). Cada población se trató como una unidad taxonómica operacional y el soporte estadístico para los nudos se obtuvo 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.

3.2.6.5. Correlación

Las relaciones entre la distancia genética (Reynolds *et al.*, 1983) y la distancia geográfica (Km) fueron analizadas mediante un análisis de regresión lineal en el programa Microsoft Excel 2007 (Correlación de Pearson).

FLUJOGRAMA



IV. RESULTADOS

4.1. Caracterización fenotípica – genotípica de los morfotipos de frutos

4.1.1. Caracterización fenotípica de los morfotipos de frutos

Los diferentes morfotipos de frutos encontrados del aguaje *Mauritia flexuosa* L. f. se caracterizaron basándose en la clasificación propuesta por Villachica, 1996: morfotipo “amarillo o ponguete”, con mesocarpio amarillo; morfotipo “color”, parte superficial del mesocarpio rojo y parte interna amarillo; y el morfotipo “shambo”, con mesocarpio totalmente rojo (Fig. 04).

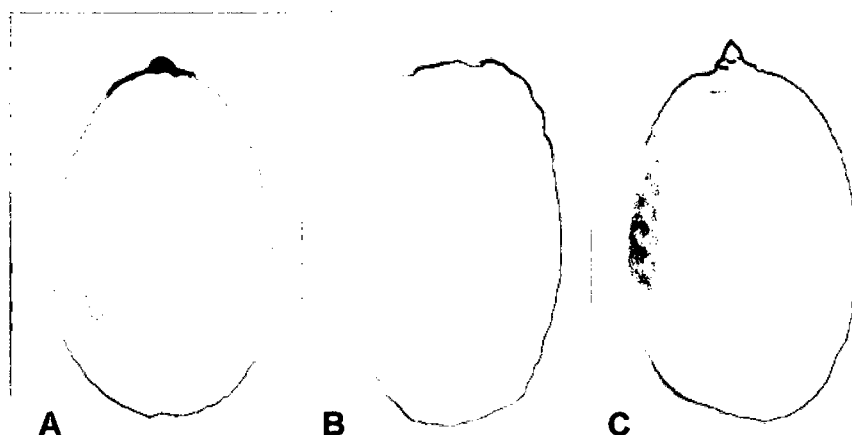


Figura 04. Color de pulpa del fruto maduro de los morfotipos amarillo (A), color (B) y shambo (C).

Nuestros resultados muestran que existe una gran variabilidad morfológica en cuanto al tamaño, forma y cantidad de pulpa de los frutos independiente del color de mesocarpio (Tab. 04). El tamaño de los frutos varía entre 3.66 a 6.78 cm de longitud y de 2.13 a 4.28 cm de diámetro (Fig. 05), mientras que la forma puede ser ovoidea o elíptica. La variabilidad observada en estas características fue independiente entre y dentro de los morfotipos.



Figura 05. Diferentes tamaños y formas de los morfotipos de frutos estudiados del aguaje *Mauritia flexuosa* L. f.

Tabla 04. Diversidad morfológica de los frutos del aguaje *Mauritia flexuosa* L. f. según morfotipos

		Shambo	Color	Amarillo
Tamaño de frutos	Diámetro longitudinal	P = 6.50 D.S = 3.88892 Mínimo = 3.66 Máximo = 6.58 n = 30	P = 5.28 D.S = 0.69711 Mínimo = 3.87 Máximo = 6.30 n = 30	P = 6.24 D.S = 0.44343 Mínimo = 5.23 Máximo = 6.78 n = 30
	Diámetro ecuatorial	P = 2.98 D.S = 0.70671 Mínimo = 2.17 Máximo = 3.92 n = 30	P = 3.39 D.S = 0.66448 Mínimo = 2.13 Máximo = 4.16 n = 30	P = 3.77 D.S = 0.31380 Mínimo = 3.35 Máximo = 4.28 n = 30
Forma		Ovoidea o elíptica		
Peso del fruto	Cáscara	P = 10.34 D.S = 3.34340 Mínimo = 6.50 Máximo = 18.03 n = 30	P = 10.27 D.S = 1.04663 Mínimo = 8.94 Máximo = 11.78 n = 30	P = 12.13 D.S = 2.49767 Mínimo = 7.4 Máximo = 15.51 n = 30
	Pulpa	P = 13.14 D.S = 2.87217 Mínimo = 9.22 Máximo = 17.74 n = 30	P = 13.75 D.S = 1.64517 Mínimo = 10.9 Máximo = 15.59 n = 30	P = 15.21 D.S = 3.91635 Mínimo = 8.93 Máximo = 21.47 n = 30
	Semilla	P = 23.67 D.S = 4.23612 Mínimo = 19.41 Máximo = 33.55 n = 30	P = 24.19 D.S = 4.03079 Mínimo = 17.84 Máximo = 30.92 n = 30	P = 27.65 D.S = 6.76767 Mínimo = 20.94 Máximo = 41.8 n = 30

Fuente: Ochoa *et al.*, 2009

Leyenda: P = Promedio; D.S = Desviación estándar; n = Tamaño de la muestra

4.1.2. Caracterización molecular de los morfotipos de frutos

4.1.2.1. Extracción de ADN y amplificación vía PCR - DALP

Se logró extraer (anexo 01) y amplificar satisfactoriamente el ADN total de las 30 muestras de tejidos foliares de aguaje *Mauritia flexuosa* L. f. de los morfotipos amarillo, shambo y color. De los ocho primers DALP utilizados en la amplificación, solo dos (DALP06 y DALP07) resultaron informativos, mostrando polimorfismo (diferenciación) en la composición de las bandas entre las muestras. Ambos marcadores generaron un total de 60 bandas de ADN polimórficas, de las cuales el primer DALP06 presentó 31 bandas polimórficas y el primer DALP07 presentó 29. No se encontraron bandas sinópticas (diferenciales entre los morfotipos), ver Tab. 05; Fig. 06 y Fig. 07.

Tabla 05. Diversidad genética de los morfotipos amarillo, color y shambo del aguaje *M. flexuosa* L. f. según el marcador DALP usado

Marcador	Total de bandas	Bandas polimórficas	PBP (%)	Bandas diagnósticas	PBD (%)
DALP 06	31	31	100	0	0
DALP 07	29	29	100	0	0
Total	60	60	100	0	0

Leyenda: PBP = Porcentaje de bandas polimórficas

PBD = Porcentaje de bandas diagnósticas

DALP06

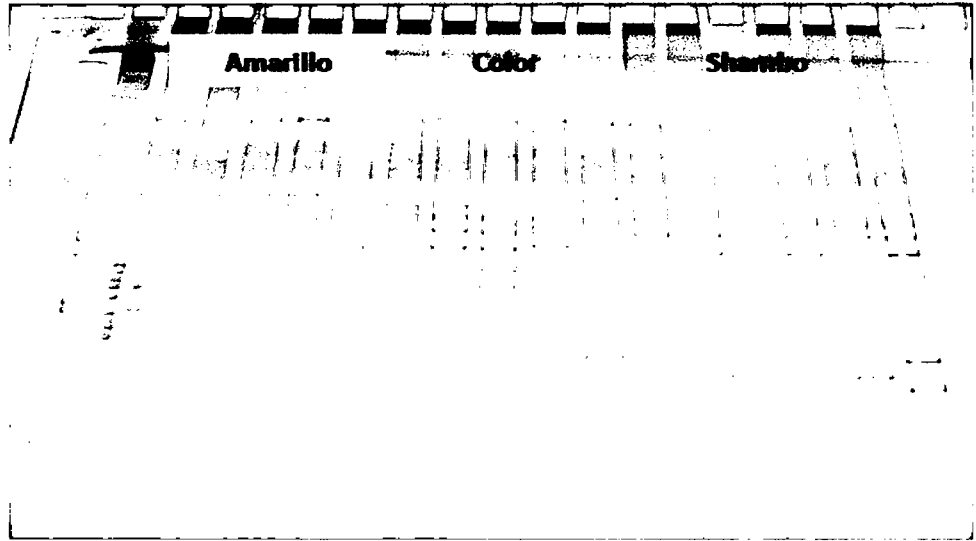


Figura 06. Gel de poliacrilamida al 6% mostrando los fragmentos amplificados de ADN de los morfotipos amarillo, color y shambo de aguaje *M. flexuosa* L. f. usando DALP06.

DALP07

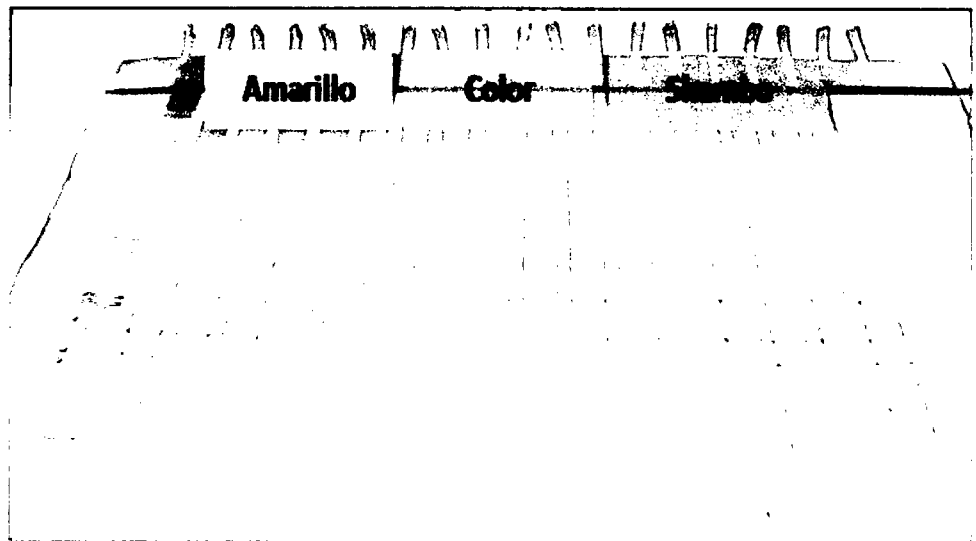


Figura 07. Gel de poliacrilamida al 6% mostrando los fragmentos amplificados de ADN de los morfotipos amarillo, color y shambo de aguaje *M. flexuosa* L. f. usando DALP07

4.1.2.2. Perfiles genéticos de los morfotipos obtenidos con PCR – DALP

La tabla 06 muestra los perfiles genéticos totales para los morfotipos amarillo, color y shambo de *M. flexuosa* L. f. determinados a partir de la suma de los resultados obtenidos con los marcadores DALP06 y DALP07. En total fueron encontrados 30 perfiles genéticos totalmente diferentes entre los tres morfotipos de aguaje. Ningún perfil genético es compartido entre los morfotipos, por lo tanto, solo observamos una variación genética individual independiente a la variación entre los morfotipos.

Tabla 06. Perfiles genéticos de los morfotipos amarillo, color y shambo obtenidos con PCR – DALP

Morfotipo	Código	DALP06	DALP07	GENOTIPO
AMARILLO	A05	ABABAAAAAABAAAABBABBBB	BBBAAAABABABAAAABBBB	ABABAAAAAABAAAABBABBBB
	A14	BBAABBBBAAAABBAABBBB	BAABBAABABBBAAAABBBB	BBAABBBBAAAABBAABBBB
	A24	BBBBBAAAAABABBBBAAABBB	BBBABABAABABBBAAAABBB	BBBBBAAAAABABBBBAAABBB
	A25	BBBBBABAAAAAABBBAABBBB	BBBABABBBBAAAABBBB	BBBBBABAAAAAABBBAABBBB
	A26	AAAAABABABABAABBBAABBBB	AABAABBAABBBBABABBBAAA	AAAAABABABABAABBBAABBBB
	A27	ABAAAABABAABBAABBBBBAAB	AABAABBAABBBBAAAABABBB	ABAAAABABAABBAABBBBBAAB
	A28	AAAAABAABAABBBAAABBBBAA	ABAABAABBBBAAAABBBBBAAB	AAAAABAABAABBBAAABBBBAA
	A29	BAABABABAABAABBBAAABBBB	ABABABBAABBBAAAABABBB	BAABABABAABAABBBAAABBBB
	A30	BBABABABABABBBBABB	BBBBBBBBBBBBBBBBBBBB	BBABABABABABBBBABB
	A31	BBABBBABBBAABBBB	BBBBBBBBBBBBBBBBBBBB	BBABBBABBBAABBBB
COLOR	C06	BBBABAABAAABABBABAABBB	BBBBBBBBBAAAABBBB	BBBABAABAAABABBABAABBB
	C07	BBAABAAAABAAABBAABBB	BBBBBAAAABBBBAAABBB	BBAABAAAABAAABBAABBB
	C08	BABAAAAABABABAABAAABBB	ABBBAAABABBBBBAABBB	BABAAAAABABABAABAAABBB
	C09	BBBBBBBBBBAAABBBBAAABBB	BBBBBABBBAABBBB	BBBBBBBBBBAAABBBBAAABBB
	C16	BAABBAABABBBBABB	ABABABAABBAABBBBAAABA	BAABBAABABBBBABB
	C17	AAABABAAAABBBAAABABBB	ABAABBBBBAABBBB	AAABABAAAABBBAAABABBB
	C23	AABBAABAABBBBAAABBBB	ABAABBBBBAABBBB	AABBAABAABBBBAAABBBB
	C33	AABBBABAAAABBBAAABBBB	AAABBBBABAABBBB	AABBBABAAAABBBBAAABBBB
	C34	ABABBBAAAABBBAAABBBB	BBBBBBBBBBBBBBBB	ABABBBAAAABBBBAAABBBB
	C49	BBBBBBBBBBBBBBBB	BBBBBBBBBBBBBBBB	BBBBBBBBBBBBBBBB
SHAMBO	S04	BABABAAAAABABABAABBBB	BAAAABAABBBBAAABBBB	BABABAAAAABABABAABBBB
	S13	BABABBAABAABAABBBAAABBB	ABAABAABAABAABBBB	BABABBAABAABAABBBAAABBB
	S15	BABBAABABABAABBBAAABBB	BBABAABAABBBB	BABBAABABABAABBBAAABBB
	S19	BBABBBAAAABAAAABBBB	BBAAAABBAABBBB	BBABBBAAAABAAAABBBB
	S21	BABBABAAAAABABBABAABBB	BBBABABABBBBAAABBBB	BABBABAAAAABABBABAABBB
	S22	AAAABABAAAAABAABBBB	BAAAABBAABBBB	AAAABABAAAAABAABBBB
	S35	BAAAABAAAABBBBAAABBBB	BABABBBBAAABBBB	BAAAABAAAABBBBAAABBBB
	S36	BABAAAAAAABAABBBAAABBB	BBBABABAABBBB	BABAAAAAAABAABBBAAABBB
	S45	BBBABAAAABAAAAABBBB	BBBBBBBBBBBBBBBB	BBBABAAAABAAAAABBBB
	S46	BBBBBAAAAABAAAABBBB	BBBBBBBBBBBBBBBB	BBBBBAAAAABAAAABBBB

4.1.2.3. Análisis Factorial de Correspondencia – AFC

Los resultados del AFC muestran una sobre posición entre los diferentes morfotipos del aguaje *Mauritia flexuosa* L. f., no lográndose establecer una discriminación genética entre ellos.

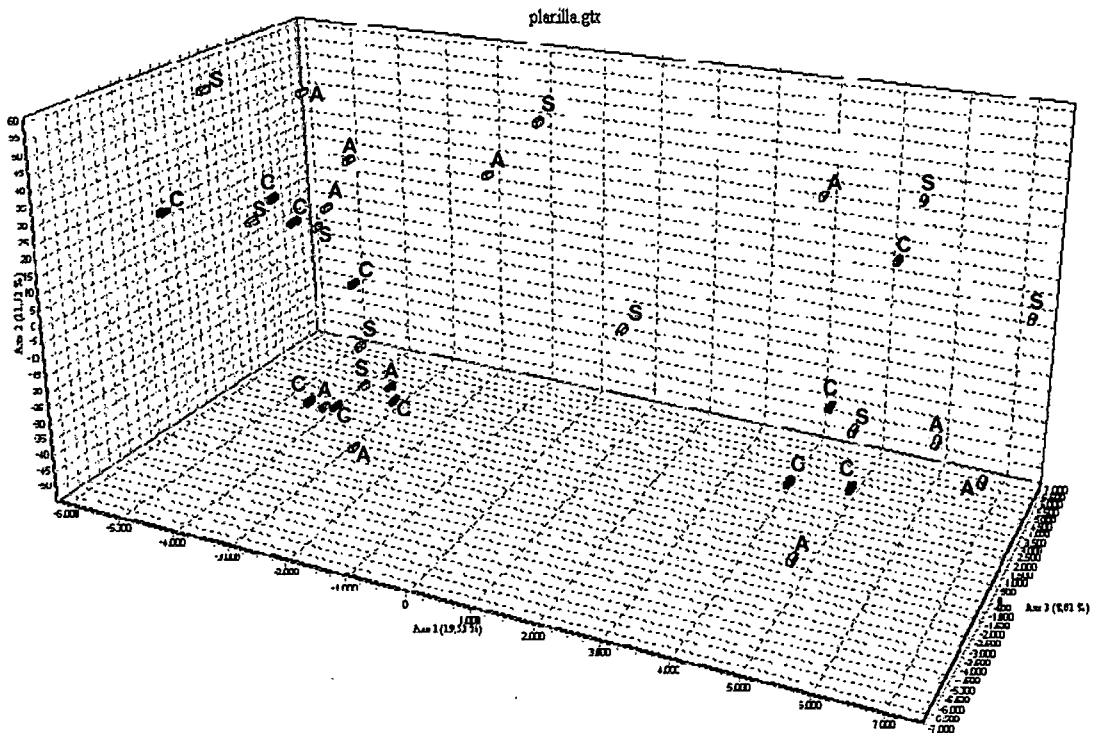


Figura 08. Representación gráfica de los resultados de Análisis Factorial de Correspondencia y distribución sobre un plan factorial para los ejes 1 (inercia 19.53 %), 2 (inercia 11,52 %) y 3 (inercia 8.01%) para los morfotipos amarillo (A), color (C) y shambo (S) de aguaje *M. flexuosa* L. f. en función a sus genotipos.

4.1.2.4. Estimador de Índice de Fijación (F_{st})

Los resultados obtenidos con el estimador F_{st} para los morfotipos amarillo, color y shambo muestra valores bajos; lo cual significa que la diferenciación genética entre los morfotipos es pequeña (según la escala propuesta por Hartl & Clark, 1997), indicando esto que no existe una estructuración definida entre los morfotipos de aguaje (Tab. 07).

Tabla 07. Matriz del Estimador F_{st} para los morfotipos amarillo, color y shambo de aguaje *Mauritia flexuosa* L. f.

Morfotipos	Amarillo	Color	Shambo
Amarillo	-----	- 0.01114***	0.00782***
Color		-----	- 0.00865***
Shambo			-----

*** No significativo a $P < 0.001$ (0.1%)

4.2. Filogeografía entre tres poblaciones naturales de aguaje amarillo

4.2.1. Extracción de ADN

Se logró extraer satisfactoriamente el ADN total de 30 muestras de tejidos foliares de aguaje amarillo de las poblaciones naturales de Aucayo, Parinari y Jenaro Herrera.

4.2.2. Amplificación Directa de Polimorfismo de Longitud – DALP

Se amplificó satisfactoriamente (vía PCR – DALP, primer DALP06) el ADN extraído de las 30 muestras de aguaje amarillo de las poblaciones naturales de Aucayo, Parinari y Jenaro Herrera; encontrándose polimorfismo (diferenciación) tanto a nivel interpoblacional como intrapoblacional. Se generaron un total de 20 bandas, de las cuales dos fueron diagnósticas (presente solo en una población) para la población de Aucayo (Tab. 08 y Fig. 11).

Tabla 08. Diversidad genética del aguaje *Mauritia flexuosa* L. f. del morfotipo amarillo según el marcador DALP06

Marcador	Total de bandas	Bandas polimórficas	PBP (%)	Bandas diagnósticas	PBD (%)
DALP 06	20	18	90	2	10
Total	20	18	90	2	10

Leyenda: PBP = Porcentaje de bandas polimórficas
PBD = Porcentaje de bandas diagnósticas

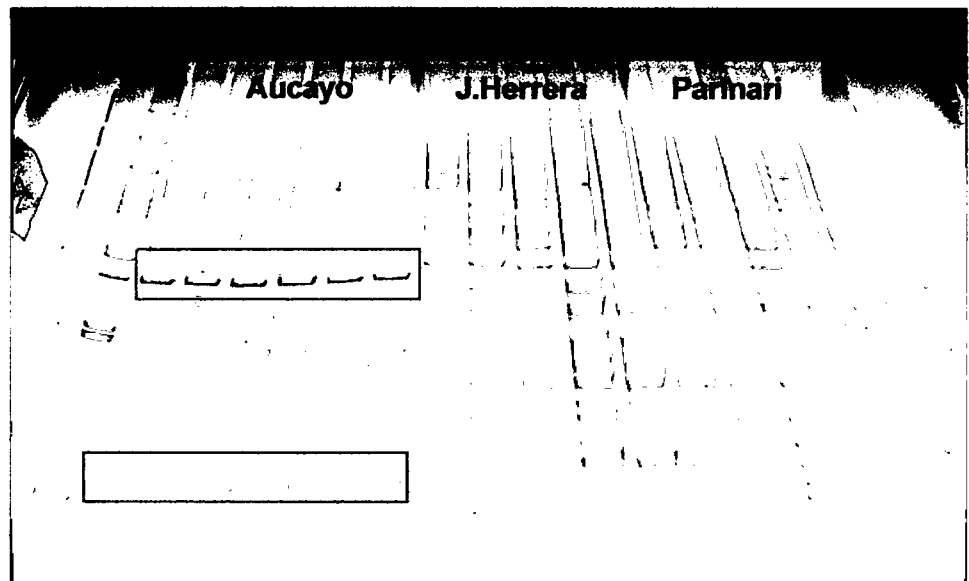


Figura 09. Gel de poliacrilamida al 6% mostrando fragmentos amplificados de ADN de las poblaciones naturales de aguaje amarillo en estudio.

4.2.3. Perfiles genéticos de las poblaciones obtenidos con PCR – DALP

La tabla 09 muestra los perfiles genéticos totales para las poblaciones naturales de aguaje amarillo, encontrándose un total de 25 perfiles genéticos. Ninguno fue compartido entre las poblaciones pero si dentro de ellas. Aucayo presentó mayor diversidad intrapoblacional (nueve perfiles), el perfil BBABBBBABABBBBBBBABB fue compartido por los individuos Au25 y Au31 (20% de la diversidad). En Jenaro Herrera se encontraron siete perfiles genéticos, BBBBBBBBBBBBBABBBBBBB fue compartido por los individuos JH02, JH03 y JH04; y en Parinari también siete, siendo que los individuos Pa08, Pa12 y Pa14 compartieron el perfil AABBAABBBBBBABBAABAA (Fig. 12, Tab. 09).

Tabla 09. Perfiles genéticos para cada población natural de aguaje amarillo obtenidos con PCR – DALP

POBLACIONES	CODIGO	DALP 06																PERFIL GENETICO			
AUCAYO	Au05	B	B	A	B	B	B	A	B	A	A	B	B	A	B	B	B	A	B	B	BBABBBABAABBABBBBABB
	Au14	B	B	A	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	A	B	B	BBABBBBBBBBBBBBABB
	Au24	B	B	A	B	B	B	B	B	A	B	A	B	B	B	B	B	A	B	B	BBABBBBBBABBBBBBABB
	Au25	B	B	A	B	B	B	B	A	B	A	B	B	B	B	B	B	A	B	B	BBABBBBABABBBBBBABB
	Au26	B	B	A	B	B	B	B	B	A	B	B	B	B	B	B	B	A	B	B	BBABBBBBABBBBBBBABB
	Au27	B	B	A	B	B	B	B	A	A	B	B	B	A	B	B	B	A	B	B	BBABBBBAABBBABBBBABB
	Au28	B	B	A	B	B	B	B	B	A	A	B	A	B	B	B	B	A	B	B	BBABBBBBBAABABBBBABB
	Au29	B	B	A	B	B	B	B	A	B	A	B	B	A	B	B	B	A	B	B	BBABBBBABABBBBABB
	Au30	B	B	A	B	B	B	B	A	A	B	A	B	A	B	B	B	A	B	B	BBABBBBAABABBBBABB
	Au31	B	B	A	B	B	B	B	A	B	A	B	B	B	B	B	B	A	B	B	BBABBBBABABBBBBBABB
JENARO HERRERA	JH01	A	B	B	B	B	B	B	A	B	B	B	B	A	B	B	B	B	B	ABBBBBBABBBABBBB	
	JH02	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	A	B	B	B	B	B	BBBBBBBBBBBABB	
	JH03	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	A	B	B	B	B	B	BBBBBBBBBBBABB	
	JH04	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	A	B	B	B	B	B	BBBBBBBBBBBABB	
	JH05	B	B	B	B	B	B	A	B	A	B	B	B	A	B	B	B	A	B	B	BBBBBABABBBABBB
	JH06	A	A	B	B	B	A	B	B	B	B	B	A	B	A	A	B	A	B	B	AABBBABBBBABAABBB
	JH07	A	A	B	A	A	A	A	B	B	B	B	A	B	A	A	B	A	B	B	AABAAAABBBBABAABBB
	JH08	A	A	B	B	A	B	A	B	B	B	B	A	B	A	A	A	A	B	B	AABBABABBBBABAABBB
	JH09	A	A	B	A	A	A	A	B	B	B	B	A	B	A	A	A	A	B	B	AABAAAABBBBABAABBB
	JH10	A	A	B	A	B	A	A	B	B	B	B	A	B	A	A	A	A	B	B	AABABAABBBBABAABBB
PARINARI	Pa02	A	A	B	A	A	A	A	B	A	B	B	B	A	B	A	B	A	B	AABAAAABBBBABAABBB	
	Pa04	A	A	B	B	A	A	A	B	A	B	A	B	A	B	A	A	A	B	B	AABBAABABABABAABBB
	Pa05	A	A	B	B	A	A	A	A	B	A	B	B	A	B	A	A	A	B	B	AABBAABABBBABAABBB
	Pa06	A	A	B	B	A	A	A	B	A	B	B	A	A	A	B	A	A	B	B	AABBAABABBAABAABBB
	Pa07	B	A	B	B	A	A	A	B	A	B	B	B	A	A	A	B	A	B	B	BABBAABABBBABAABBB
	Pa08	A	A	B	B	A	A	B	B	B	B	B	A	B	B	A	A	A	B	A	AABBAABBBBABAABBB
	Pa09	A	A	B	B	A	B	A	B	B	B	B	A	B	A	A	A	A	B	B	AABBABABBBBABAABBB
	Pa10	A	A	B	B	A	A	B	B	B	B	B	A	B	A	A	A	A	B	A	AABBAABBBBABAABBB
	Pa12	A	A	B	B	A	A	B	B	B	B	B	A	B	B	A	A	A	B	A	AABBAABBBBABAABBB
	Pa14	A	A	B	B	A	A	B	B	B	B	B	A	B	B	A	A	A	B	A	AABBAABBBBABAABBB

4.2.4. Análisis Factorial de Correspondencia – AFC

La proyección gráfica del Análisis Factorial de Correspondencia muestra tres entidades genéticas independientes. Entre las cuales, la población de Aucayo se mostró más distante de las poblaciones de Jenaro Herrera y Parinari.

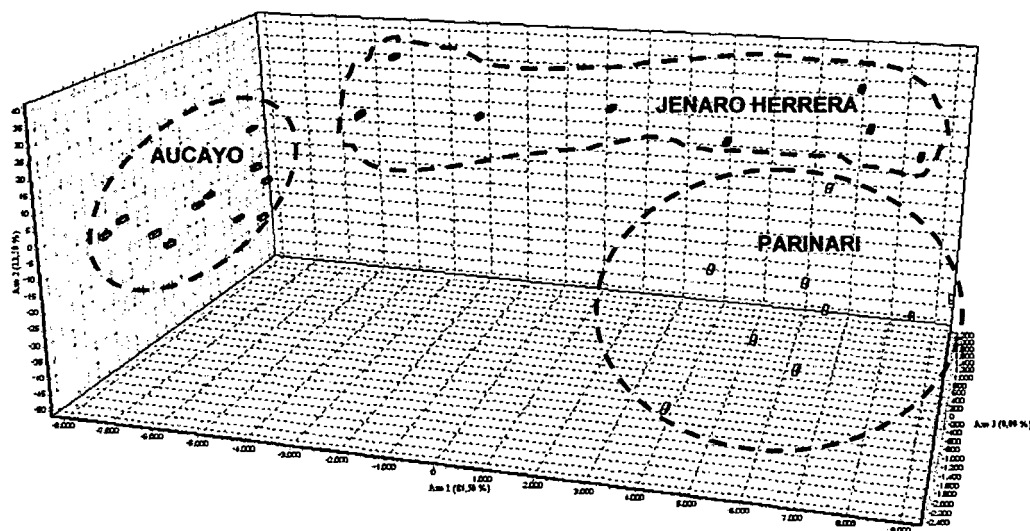


Figura 11. Representación gráfica de los resultados del AFC y su distribución sobre un plan factorial para los ejes 1 (inercia 86.50%), 2 (inercia 13.50%) y 3 (inercia 0.00%) de tres poblaciones naturales de aguaje amarillo en función a sus genotipos

4.2.5. Estimador de Índice de Fijación (F_{st})

El estimador F_{st} muestra valores significativos a $P < 0.001$ (0.1%) entre todas las poblaciones naturales de aguaje amarillo (Tab. 10). Aucayo y Parinari presentaron la mayor diferenciación genética ($F_{st} = 0.68338$), en tanto que Aucayo con Jenaro Herrera presentaron valores intermedios ($F_{st} = 0.48382$); estos valores son considerados muy altos según la escala propuesta por Hartl & Clark, 1997 (tab. 03). La menor diferencia genética

fue encontrada entre Jenaro Herrera y Parinari ($F_{st} = 0.20962$), valor considerado alto en la escala de propuesta por Hartl & Clark, 1997.

Tabla 10. Matriz del Estimador F_{st} para las tres poblaciones naturales de aguaje del morfotipo amarillo

Poblaciones	Aucayo	Jenaro Herrera	Parinari
Aucayo	-----	0.48382***	0.68338***
Jenaro Herrera		-----	0.20962***
Parinari			-----

*** Significativo a $P < 0.001$ (0.1%)

4.2.6. Distancia genética

La distancia genética estimada según Reynolds *et al.*, 1983, muestra que las poblaciones de Aucayo y Parinari fueron mas distantes genéticamente ($D = 1.13434$). Mientras que las poblaciones de menor distancia genética fueron Jenaro Herrera y Parinari ($D = 0.21052$).

Tabla 11. Matriz de distancias genéticas para las tres poblaciones naturales de aguaje del morfotipo amarillo

Poblaciones	Aucayo	Jenaro Herrera	Parinari
Aucayo	-----	0.66130***	1.13434***
Jenaro Herrera		-----	0.21052***
Parinari			-----

*** Significativo a $P < 0.001$ (0.1%)

Tabla 12. Matriz de distancia genética y distancia geográfica de las tres poblaciones naturales de aguaje amarillo en estudio

Poblaciones	Distancia geográfica (Km)	Distancia genética (Reynolds <i>et al.</i>, 1983)
Aucayo – J. Herrera	131,49	0,6613
Aucayo – Parinari	174,94	1,1343
J. Herrera – Parinari	98,37	0,2343

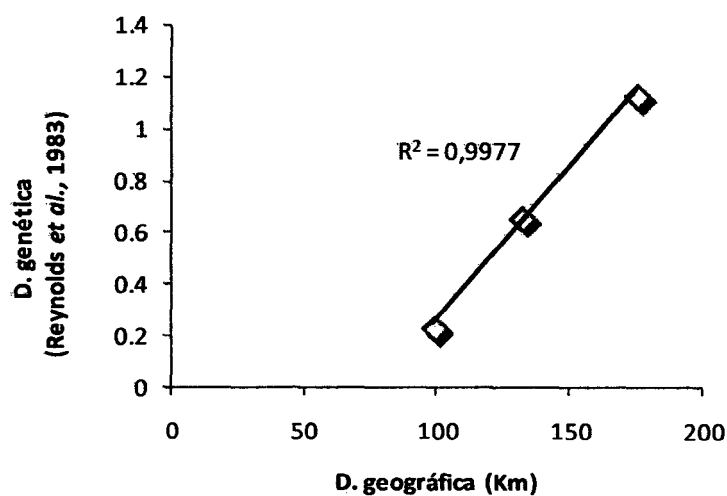


Figura 13. Representación gráfica de la correlación entre distancia genética y distancia geográfica de las tres poblaciones naturales de aguaje amarillo.

V. DISCUSIÓN

5.1. Caracterización fenotípica – genotípica de los morfotipos

Hasta el momento la investigación científica y técnica sobre el aguaje *Mauritia flexuosa* L. f. estuvo principalmente enfocada al estudio de aspectos sobre su biología, ecología, agroforestería y cuidado fitosanitario (Galeano, 1991; Cavalcante, 1991; Storti, 1993; Villachica, 1996; Mejía, 1997; Oré *et al.*, 1997; Penn, 1999; Hiraoka, 1999; De Paula Fernandes, 2001; Bejarano & Piana, 2002; PRONATURALEZA, 2005; del Castillo *et al.*, 2006; Delgado *et al.*, 2007). La escasa información sobre la genética molecular de esta especie estuvo direccionada a establecer relaciones filogenéticas del aguaje dentro de la familia Arecaceae (Pintaud *et al.*, 2007) y a la búsqueda de marcadores moleculares RAPD para la determinación del sexo en el aguaje (Rengifo, 2008). La información sobre la caracterización fenotípica de los morfotipos amarillo, color y shambo de *M. flexuosa* L. f. está limitada a pocos estudios; uno de ellos, realizado por Villachica en 1996, solo hace la discriminación y denominación de estos morfotipos únicamente por el color que manifiesta la pulpa de los frutos, no existen estudios de esta diferenciación morfotípica a nivel genético.

Los resultados obtenidos en esta investigación con los marcadores moleculares DALP06 y DALP07 no muestran un carácter genético padronizado para cada uno de los morfotipos. Encontrándose elevados niveles de polimorfismo (variación genética) entre los individuos, aunque esta variación fue independiente de las variaciones observadas en el color del fruto, lo cual podría indicar que estos morfotipos son únicamente

variaciones del carácter color, es decir, variaciones fenotípicas más no genotípicas. Esto podría ser explicado por la gran variabilidad que presenta el aguaje en su sistema de reproducción sexual: a) polígamo (Pio Correa, 1926), b) dioico o polígamo dioico (Cavalcante, 1991), y c) xenógama (Storti, 1993), que permiten la polinización entre diferentes individuos o plantas de la misma especie. Además, esta especie presenta polinización cruzada por el viento (anemofilia), que coadyuva a potenciar la eficiencia de fecundación entre individuos de la misma especie que crecen unos junto a otros (Raven *et al.*, 1996); y si sumamos a ello la participación de sus polinizadores (principalmente insectos pertenecientes a las familias Nitidulidae, Curculionidae y Cucujidae del orden Coleoptera; y Apidae del orden Hymenoptera) y de sus dispersores de semillas como ungulados, roedores, monos, aves, quelonios y peces (Goulding, 1989; Hiraoka, 1999), hace suponer que la amplia variación fenotípica observada en cuanto al color, tamaño y forma encontrado dentro y entre los morfotipos estudiados de esta especie podría relacionarse con estos factores. O también a variaciones intraespecíficas como una respuesta a condiciones edáficas, topográficas o bióticas muy específicas de las áreas (Turesson, 1922; 1925).

5.2. Filogeografía entre tres poblaciones naturales de aguaje amarillo

Los marcadores moleculares son fundamentales para estudiar la variabilidad genética entre poblaciones naturales. En especies como el aguaje *Mauritia flexuosa* L. f., donde no existen marcadores específicos, los marcadores moleculares como el marcador DALP que utilizan primers

universales, son herramientas fundamentales para la evaluación de su diversidad molecular a nivel poblacional. Este marcador ha sido utilizado exitosamente para establecer las diferencias genéticas entre especies de plantas como *Panax ginseng* y *Panax quinquefolius* (HA *et al.*, 2001) así como en poblaciones naturales de *Stephania yunnanensis* (Yun – shu, *et al.*, 2008). También a sido utilizado exitosamente en diferentes especies de animales como ratones *Mus musculus musculus* y *M. musculus domesticus*, peces como tilapia *Oreochromis niloticus* y *Sarotherodon melanotheron*, aves *Larus cachinnans* y *L. audouinii*, mejillones *Mytilus galloprovincialis* y *M. edulis*, y un ácaro *Amblyseius californicus* (Desmarais *et al.*, 1998), obteniéndose resultados exitosos a nivel intra e interpoblacional.

Los resultados obtenidos utilizando el marcador molecular DALP06 muestran elevados niveles de variabilidad genética dentro y entre las poblaciones naturales de aguaje amarillo. En total se encontraron 25 genotipos diferentes distribuidos entre las tres poblaciones, en la población de Aucayo de los 10 individuos analizados nueve presentaron diferencias en sus perfiles genotípicos, en Jenaro Herrera se encontraron siete genotipos y en Parinari siete genotipos mas, ninguno de estos genotipos fue compartido entre las poblaciones. Estos altos niveles de variabilidad genética encontrados eran como esperados tratándose de poblaciones naturales de una especie que posee una diversidad de estrategias reproductivas (polígamo, dioico o polígamo dioico y xenógama) y una amplia gama de agentes polinizadores y dispersores de semillas que

contribuyen al mantenimiento de la diversidad genética y disminuyen las posibilidades de erosión genética dentro de las poblaciones (Pio Correa, 1926; Cavalcante, 1991; Storti, 1993; Raven *et al.*, 1996; Goulding, 1989; Hiraoka, 1999).

Así mismo en los resultados obtenidos en el dendrograma UPGMA generado a partir de las distancias genéticas estimadas según Reynolds *et al.*, 1983 (Fig. 14), observamos tres poblaciones bien estructuradas sin sobreposición entre ellas. Esto es reforzado por la ausencia de genotipos compartidos entre las poblaciones, y puede ser explicado por las grandes distancias geográficas y la existencia de los ríos que actúan como barreras naturales entre ellas, restringiendo el flujo de genes entre las poblaciones. Esto es corroborado por los resultados de correlación de distancia genética y distancia geográfica entre las poblaciones ($R^2 = 0.9977$; $P = 0,768$). Observándose que la población de Aucayo muestra mayor distancia genética respecto a las otras poblaciones (Aucayo - J. Herrera = 0.66130, Aucayo - Parinari = 1.13434) y que las poblaciones de Jenaro Herrera y Parinari son las mas cercanas genética (distancia = 0.21052) y geográficamente (98.37 km, ver Fig 16). Estas afirmaciones son corroboradas también por los resultados de F_{st} donde se observa que las poblaciones de Jenaro Herrera y Parinari presentan el F_{st} más bajo (0.20962).

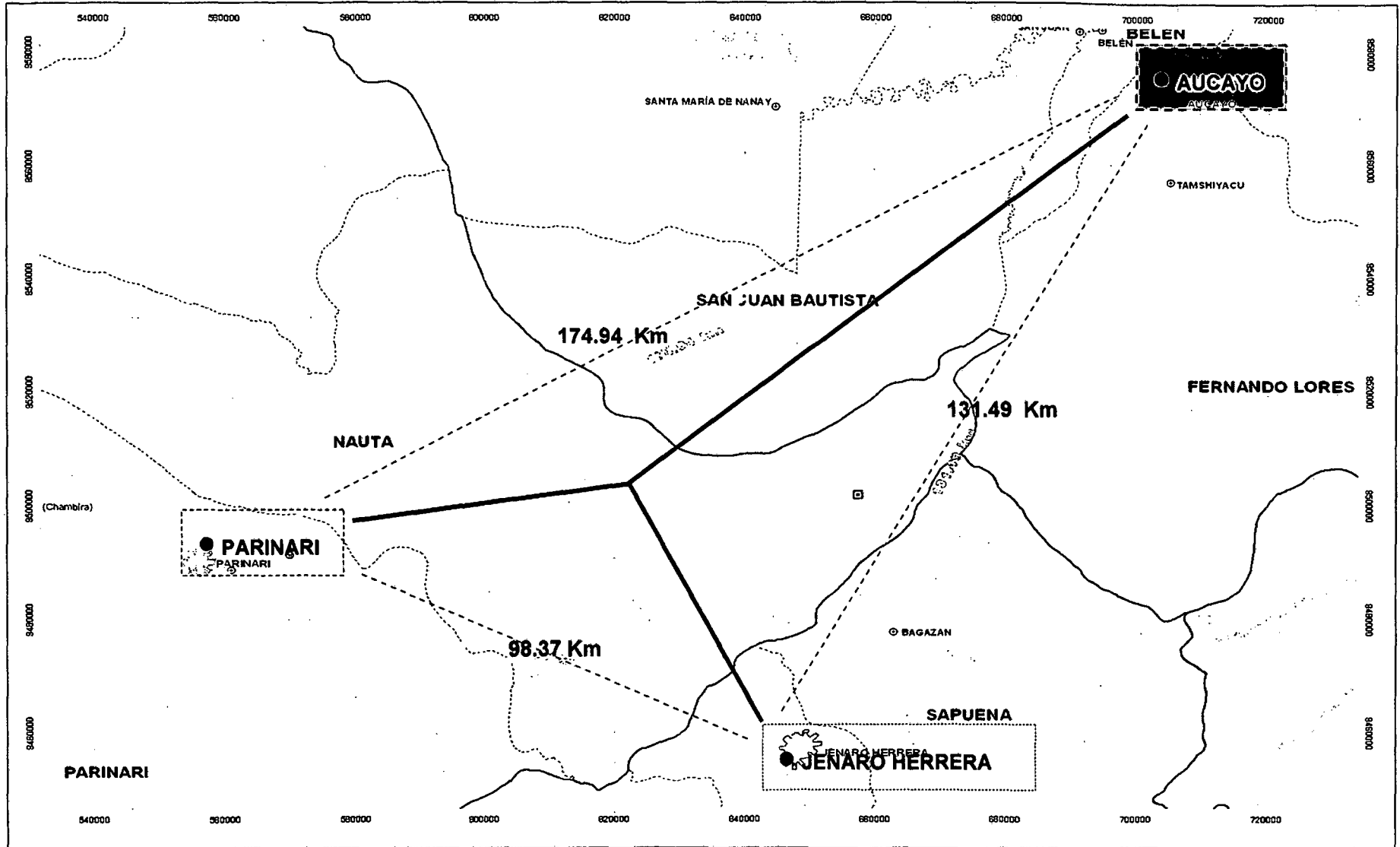


Figura 14. Dendrograma de similitud (UPGMA) generado en base a la distancia genética de Reynolds *et al.*, 1983 entre las tres poblaciones naturales de aguaje *Mauritia flexuosa* L. f. del morfotipo amarillo

VI. CONCLUSIONES

- ❖ Los marcadores DALP06 y DALP07 resultaron polimórficas para el análisis de los morfotipos amarillo, color y shambo de aguaje *Mauritia flexuosa* L. f.
- ❖ Los morfotipos amarillo, color y shambo del aguaje *Mauritia flexuosa* L. f. presentaron una variación genética individual independiente de la variación morfológica entre los frutos. Lo cual podría indicar que estos morfotipos son variaciones del carácter color no marcado en el genotipo y podría ser la respuesta a otros factores ambientales.
- ❖ El marcador DALP06 resultó diagnóstica (diferencial) para la población de Aucayo pues mostró regiones exclusivas para su caracterización genética.
- ❖ Existen niveles importantes de diferenciación genética en las poblaciones naturales del morfotipo amarillo de Aucayo, Jenaro Herrera y Parinari tanto a nivel intra e interpoblacional.
- ❖ La restricción del flujo genético entre poblaciones podría deberse a un conjunto de factores como: la presencia de barreras naturales, la distancia geográfica y el sistema de polinización que actuaría preferentemente a nivel intrapoblacional. Sumado a que en décadas recientes el daño a los bosques con la consecuente fragmentación de los mismos, contribuiría fuertemente a la pérdida y reducción de las poblaciones naturales de aguaje interconectantes con la consecuente pérdida de stocks genéticos de esta especie.

VII. RECOMENDACIONES

- ❖ Estos resultados son un primer paso para incentivar y continuar con investigaciones que enfoquen y aclaren muchas interrogantes en el estudio de los morfotipos y poblaciones naturales de esta especie.
- ❖ Para corroborar estos resultados se debería analizar la influencia del medio ambiente en la determinación del fenotipo, realizando cruzamientos mendelianos entre los morfotipos en situación de medio ambiente controlado.
- ❖ En futuros estudios, es importante considerar ampliar el número de individuos y poblaciones naturales, el uso de otros marcadores moleculares, así como datos morfométricos con la finalidad de corroborar estos resultados.

VIII. RESUMEN

La variabilidad genética del aguaje *Mauritia flexuosa* L. f. es aún compleja debido a la escasa información sobre estudios moleculares en esta especie. Para tal efecto, esta información genética limitada se pretende ampliar mediante la caracterización molecular de los morfotipos de frutos de *Mauritia flexuosa* L. f. usando como herramienta de diagnóstico molecular el marcador molecular DALP (Amplificación Directa de Polimorfismo de Longitud). Un total de 50 muestras de tejido foliar fueron utilizadas para estudios de caracterización molecular de los morfotipos amarillo, color y shambo, así como para el estudio de la variabilidad genética poblacional de aguaje amarillo. Resultados de la caracterización genética de morfotipos mostraron variación genética individual independiente de la variación morfológica observada entre los frutos, como una posible variación del carácter color no marcado en el genotipo, y que podría ser respuesta, sin embargo, a factores ambientales. Resultados AFC del estudio de variabilidad genética poblacional mostraron tres poblaciones bien estructuradas, así como una alta correlación entre la distancia genética y geográfica ($R^2 = 0.9977$; $P = 0,768$). La población de Aucayo mostró mayor distancia genética respecto a Jenaro Herrera ($D = 0.66130$) y Parinari ($D = 1.13434$). Mientras que las poblaciones de J. Herrera y Parinari presentan el F_{st} más bajo (0.20962). Estos resultados pueden ser explicados por las grandes distancias geográficas y la existencia de ríos que actúan como barreras naturales entre ellas, restringiendo así el flujo de genes entre las poblaciones.

PALABRAS CLAVE: *Mauritia flexuosa* L. f., DALP, caracterización molecular, morfotipos, variabilidad genética poblacional

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKKAYA, M. S.; BHAGWAT, A. A.; CREGAN, P. B. 1992. Length polymorphisms of simple sequence repeat DNA in soybean. *Genetics*. Vol. 132, pp. 1131 – 1139.

AZOFEIFA – DELGADO, 2006. Uso de marcadores moleculares en plantas; aplicaciones en frutales del trópico. *Agronomía Mesoamericana*. Vol. 17 (2), pp. 221 – 242. ISSN: 1021 – 7444.

BALICK, M. J. 1979. b. Amazonian oil palms of promise: a survey. The New York. The Botanical Garden. *Economic Botany*, vol. 33 (1), pp. 11 – 28.

BECERRA, V.; PAREDES, M. 2000. Uso de Marcadores Bioquímicos y Moleculares en estudios de Diversidad Genética. Instituto de investigaciones Agropecuarias, Centro Regional de Investigación Quilamapu. Chillán, Chile.

BECKER, J.; HEUM, M. 1995. Barley microsatellites: allele variation and mapping. *Plant Molecular Biology*. Vol. 27, pp. 835 – 845.

BEJARANO, P.; PIANA, R. 2002. Plan de manejo de los aguajales aledaños al caño Parinari. Iquitos, Perú. 44 p.

- BELKHIR, K.; BURSCE, P.; CHICHI, I.; RAUFAST, N.; BURHOMME, F.; 2004. Genetix 4.05.2. Logiciel sous windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire genome, populations, interactions, CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II, Montpellier, France.
- BORNET, B.; BRANCHARD, M. 2001. Non-anchored Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) Markers: Reproducible and Specific Tools for Genome Fingerprinting; *Plant Molecular Biology Reporter*. Vol. 19, pp. 209 – 215.
- BRONDANI, R.; BRONDANI, C.; TARCHINI, R.; GRATTAPAGLIA, D. 1998. Development, characterization and mapping of microsatellite markers in *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla*. *Theoretical and Applied Genetics*. Vol. 97, pp. 816 – 827.
- CAVALCANTE, P. 1991. Frutas comestíveis da Amazônia. Quinta edição. Belem: Museu Paraense Emílio Goeldi. Brasil. 279 p.
- CORADIN, L.; LLERAS, E. 1988. Overview of palm domestication in latin America. *Advances in Economic Botany*. Vol. 6, pp. 175 – 189.
- DE PAULA FERNANDES, N.M. 2001. *Estratégias de produção de sementes e stabelecimento de plântulas de Mauritia flexuosa L. f. (Arecaceae) no Vale do Acre, Brasil*. Tese de Doutorado, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/ Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 203 p.

- DEL CASTILLO, D.; FREITAS, L.; OTÁROLA, E. 2006. Aguaje, la maravillosa palmera de la Amazonía peruana. Wust Ediciones. Iquitos, Perú. 52 p.
- DELGADO, C; COUTURIER, G; MEJÍA, K. 2007. *Mauritia flexuosa* L. f. (Arecaceae: Calamoideae), an Amazonian palm with cultivation purposes in Peru. *Fruits*. Vol. 62 (3), pp. 1 – 12.
- 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*. Vol. 26 (6), pp. 1458 – 1465.
- DOYLE, J. J.; DOYLE J. L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical*. Vol. 19, pp. 11 – 15.
- ECK, R. V.; DAYHOFF, M. O. 1966. Atlas of protein. Sequence and structure. National Biomedical Research. Foundation, Silver Spring. Maryland.
- FELSENSTEIN, J. 1993. Phylogeny Inference Package (PHYLIP). Version 3.5. University of Washington, Seattle. Washington. 132 p.
- FERREIRA, M.; GRATTAPAGLIA, D. 1998. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. Tercera edición. Brasília: EMBRAPA – CENARGEN. 220 p.

- GALEANO, G. 1991. Las palmas en la región de Araracuara. Primera edición. Bogotá, Colombia. 45 p.
- GENTRY, 1993. A Field guide to the Families and Genera of woody Plants of Norwest South America (Colombia, Ecuador, Perú) with supplementary notes on herbaceous taxa. Department of Conservation, Biology – Conservation International. Washington, D.C., USA. 95 p.
- GOULDING, M. 1989. Amazon: The Flooded Forest. BBC, London.
- 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), pp. 587 – 589.
- HARTL, D.; CLARK, A. 1997. Principles of Population Genetics. Third edition. Sinauer Associates, Inc. Publishers Sunderland, Massachusetts, 542 p.
- HENDERSON, A. 1995. The Palmae of the Amazon. Oxford University Press, New York. 326 p.
- HIRAOKA, M. 1999. Miriti (*Mauritia flexuosa* L. f.) Palms and their uses and management among the ribeirinhos of the Amazon Estuary. In: Padoch, C.; Ayres J. M.; Pinedo – Vásquez, M.; Henderson, A. (ed). *Varzea, diversity, development, and conservation of amazonas withwater floodplains*. The New York Botanical Garden. 407 p.

INRENA. 2000. Plan Maestro para la Conservación de la Diversidad Biológica y el Desarrollo Sostenible de la Reserva Nacional Pacaya Samiria y su Zona de Amortiguamiento. Ministerio de Agricultura. Loreto – Perú, 2000. 153 p.

KAHN, F.; LEÓN, B.; YOUNG, K.R. 1993. Las plantas vasculares en las aguas continentales del Perú. IFEA, Lima. 321p.

KALLIOLA, R. 1993. Amazonía Peruana, vegetación húmeda tropical en el llano subandino. Proyecto Amazonía, Universidad de Turku. Turku, Finlandia. 265 p.

KLUGE, A. G.; FARRIS, J. S. 1969. Quantitative phyletics and the evolution of anurans. *Systematic Zoology*. Vol. 18, pp. 1 – 32.

MANIATIS, T.; SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F. 1989. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. Second Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press; New York.

MEJÍA, K. 1997. Utilización de las palmeras en la amazonía peruana. EN: V Seminario-Taller Internacional 'Sistemas Sostenibles de Producción Agropecuaria' y Primer Seminario Internacional 'Palmas en Sistemas de Producción Agropecuaria para el Trópico. Cali, Colombia.

MONTES DE OCA, I. 1997. *Geografía de Recursos Naturales de Bolivia*. Academia Nacional de Ciencias de Bolivia. Bolivia. 226 p.

ORÉ, I.; KVIST, L.; GRAM, S.; CÁCERES A., 1997. Proyecto Inventarios Forestales y Socioeconomía en Reserva Nacional Pacaya Samiria. Reporte Zona Samiria. *Convenio PPS – WWF/DK – RVAU*.

PADOCH, C. 1988. Aguaje (*Mauritia flexuosa* L. f.) in the economy of Iquitos, Peru Adv. Econ. Bot., Vol. 6, pp. 214 – 224.

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.

PENN, J. 1999. The Aguaje Palm (*Mauritia flexuosa* L. f.): Examining its Role as an Agroforestry Species in a Community Conservation Project. Tesis de Master en Artes.

MARIE-JEANNE PERROT-MINNOT, M-J.; LAGNEL, J.; DESMARAIS, E.; NAVAJAS, N. 2000. Isolation and characterization by direct amplification of length polymorphisms (DALP) of co-dominant genetic markers with Mendelian inheritance in *Neoseiulus californicus* (Acari: Phytoseiidae). *Experimental and Applied Acarology*. Vol. 24. pp. 795 – 803.

PHILLIPS, 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 p.

- PINTAUD, J. – C.; COUVREUR, T. L. P.; HAHN, W. J.; DE GRANVILLE, J. – J.; PHAM, J. – L.; LUDEÑA, B. 2007. Phylogenetic Relationships of the Cultivated Neotropical Palm *Bactris gasipaes* (Arecaceae) with its Wild Relatives Inferred from Chloroplast and Nuclear DNA Polymorphisms. *Systematic Botany*. Vol. 32 (3). pp. 519 – 530.
- PIO CORREA, M. 1926 Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Imprensa Nacional, Rio de Janeiro. v. I.
- 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 Semiarid Tropics. pp. 297 – 322.
- PRONATURALEZA. 2005. Plan de Manejo Forestal *Mauritia flexuosa* “aguaje” Reserva Nacional Pacaya Samiria. Informe Técnico. Loreto, Perú. 52 p.
- RALLO, P., BELAJ, A., DE LA ROSA, R., TRUJILLO, I. 2002. Marcadores moleculares (en línea). Córdoba, España. Consultado 1 agosto.
- RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. 1996. *Biología vegetal*. Quinta edición. Guanabara Koogans, Rio de Janeiro. 728 p.
- RENGIFO, D. 2008. Marcadores RAPD ligados al sexo de *Mauritia flexuosa* L. f. aguaje (Arecaceae) en el distrito de San Juan Bautista, Loreto, Perú.

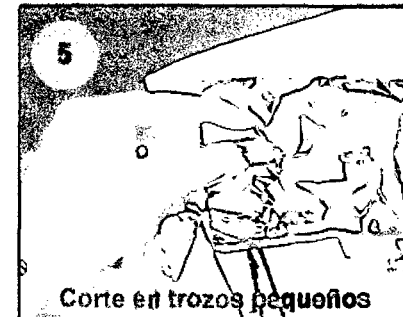
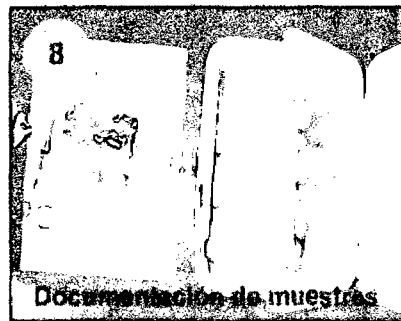
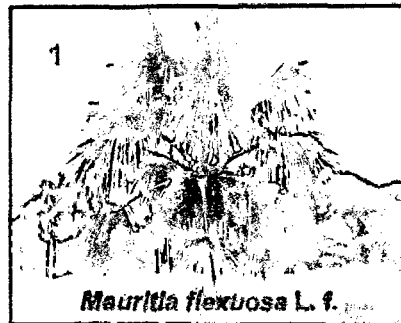
- REYNOLDS, J.; WEIR, B. S.; COCKERHAM, C. C. 1983. Estimation of the coancestry coefficient: basis for a short-term genetic distance. *Genetics*. Vol. 105, pp. 767 – 779.
- RÖDER, M.S.; PLASCHKE, J.; KÖNING, S.V.; BÖRNER, A.; SORRELS, M.E.; TANSKLEY, S.D.; GANAL, M.W. 1995. Abundance, variability and chromosomal location of microsatellites in wheat. *Molecular Genetics*. Vol. 246, pp. 327 – 333.
- SENIOR, M.; HEUM, M. 1995. Mapping maize microsatellites and polymerase chain reaction confirmation of the targeted repeats using a ct primer. *Genome*. Vol. 36, pp. 884 – 889.
- STORTI, E. 1993. Biología floral de *Mauritia flexuosa* L. f. na regio de Manaus, Amazonas, Brasil. *Acta amazónica*. Vol. 23 (4), p. 371 – 381.
- TANKSLEY, S. 1983. Molecular markers in plant breeding. *Plant Molecular Biology Reporter*. Vol. 1, pp. 3 – 8.
- TURESSON, G. 1922. The genotypical response of the plant species to the habitat. *Hereditas*. Vol. 3, pp. 211 – 350.
- TURESSON, G. 1925. The plant species in relation to habitat and climate. *Hereditas*. Vol. 6, pp. 147 – 236.

- UHL, N.W.; DRANSFIELD, J. 1987. Genera Palmarum, basados en los trabajos de Harold E. Moore Jr. The L. H. Bailey Hortorium and Internacional Palm Society. 610 p.
- VICKERS, W. 1976. Cultural adaptation to Amazonian habitats: The Siona-Secoya of Easter Ecuador. Gainesville (USA): University of Florida, Tesis Ph.D.
- VILLACHICA, H. 1996. Frutales y hortalizas promisorios de la Amazonía. Tratado de Cooperación Amazónica. Lima, Perú. 367 p.
- WEIR, B. S. & COCKERHAM, C. C. 1984. Estimating F – statistics for the analysis of population structure. Evolution. Vol. 38, pp. 1358 – 1370.
- WEIR, B.S. 1990. Análisis de datos genéticos. Sinauer, Suderland, MA.
- WU, K.S. & TANSKLEY, S.D. 1993. Abundance, polymorphism and genetic mapping of microsatellites in rice. Molecular Genetics. Vol. 241, pp. 225 – 235.
- YUN – SHU, M.; HONG, Y.; YONG – YI, L.; HONG, Y.; XIN, C. 2008. A Study of Genetic Structure of *Stephania yunnanensis* (Menispermaceae) by DALP. Biochemistry Genetics. Vol. 46, pp. 227 – 240.

ANEXO

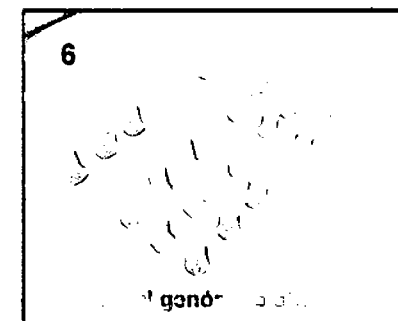
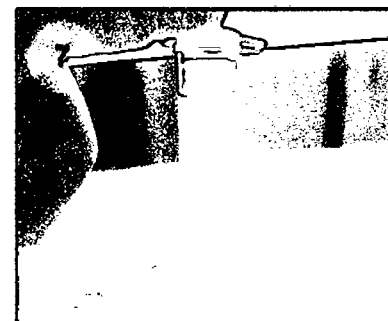
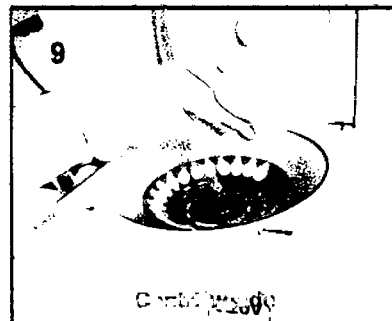
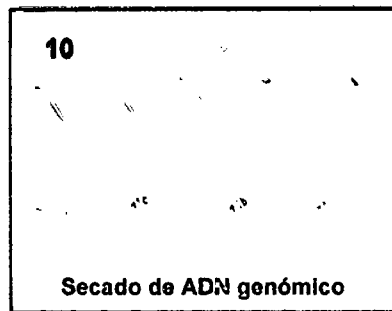
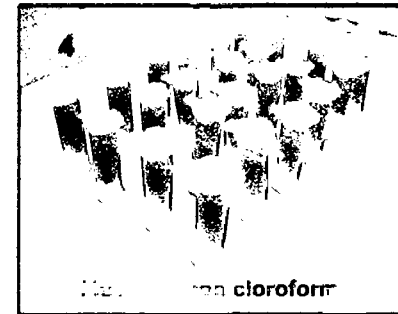
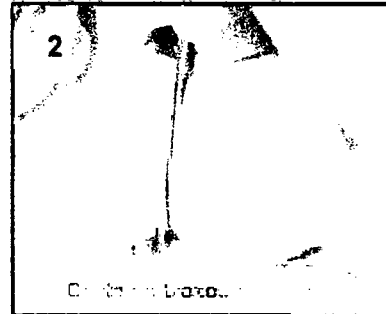
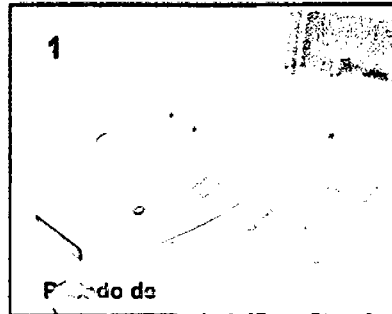
ANEXO 01

OBTENCIÓN DEL MATERIAL BIOLÓGICO DE *Mauritia flexuosa* L. f.



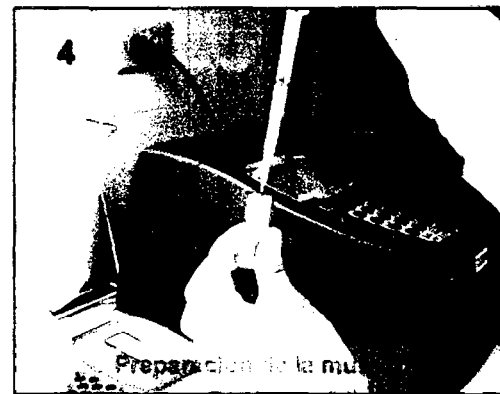
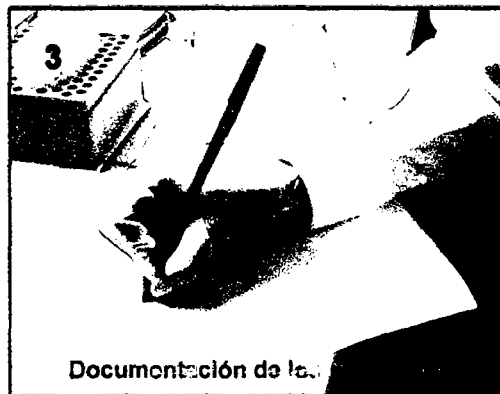
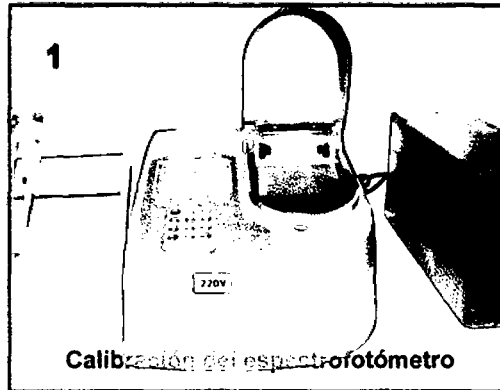
ANEXO 02

EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO DE *Mauritia flexuosa* L. f. – MÉTODO CTAB (DOYLE & DOYLE, 1987)



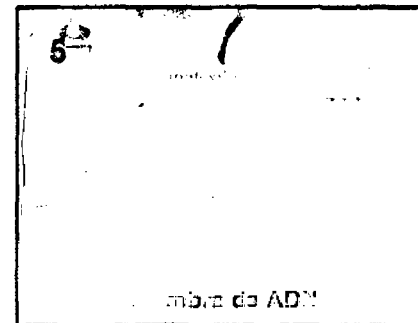
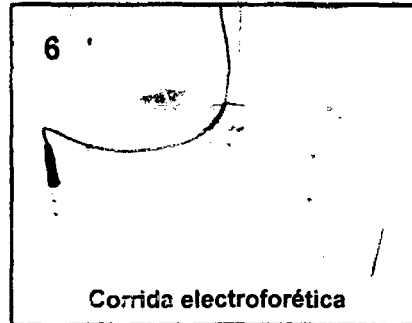
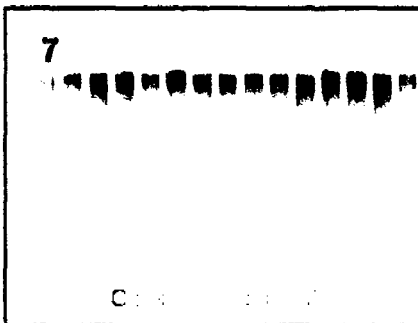
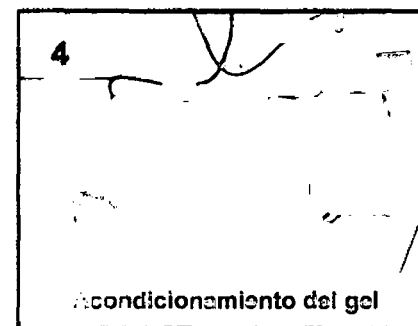
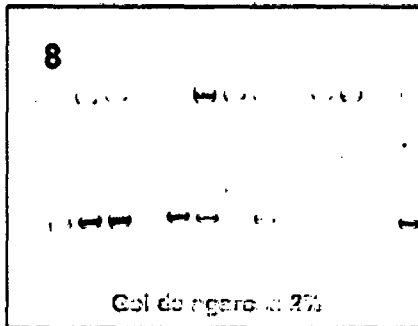
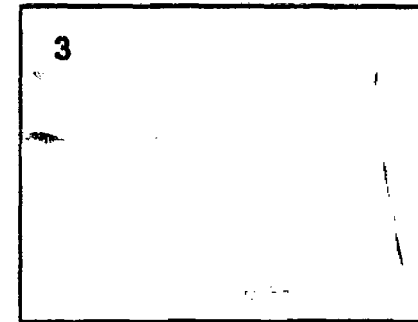
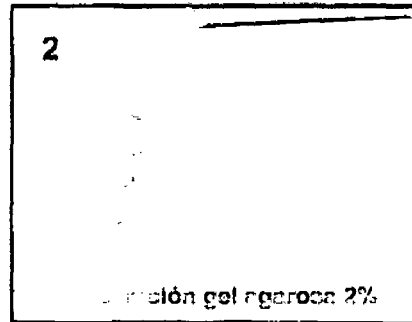
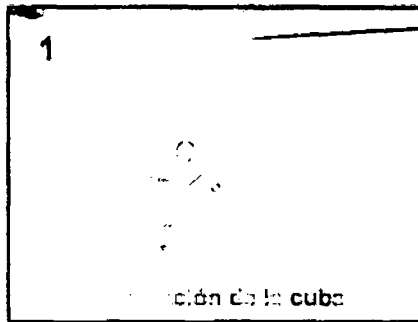
ANEXO 03

ESPECTROFOTOMETRÍA DEL ADN GENÓMICO EXTRAÍDO DE *Mauritia flexuosa* L. f. - MÉTODO DE MANIATIS, 1989



ANEXO 04

ELECTROFORESIS DEL ADN EXTRAÍDO Y DE LOS PRODUCTOS AMPLIFICADOS VÍA DALP – PCR EN GELES DE AGAROSA



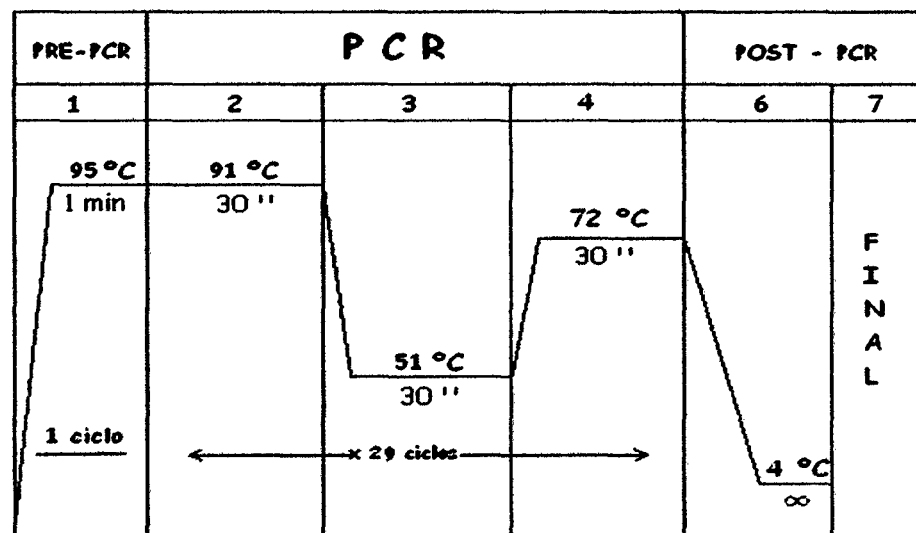
ANEXO 05

CONDICIONES ÓPTIMAS PARA LA AMPLIFICACIÓN DE ADN DE *Mauritia flexuosa* L. f. USANDO PRIMER DALP06 (Desmarais *et al.*, 1998)

PRIMER DALP 06					
Reactivo	C ₁	C ₂	V ₁	Nº muestras	V ₂
Buffer	5X	1X	5	12,5	62,50
Mg Cl2	25mM	3.1mM	3,1	12,5	38,75
DALP P3	10uM	0,8uM	2	12,5	25,00
DALP PR	10uM	0,8uM	2	12,5	25,00
dNTP's	10mM	0,3mM	0,75	12,5	9,38
Taq	5u/ul	0,075u/ul	0,375	12,5	4,69
PRE MIX TOTAL			13,23		165,31

Agua mili-Q	9,77
DNA	2
Volumen total	25ul

Leyenda: C₁= Concentración inicial; C₂= Concentración final;
V₁= Volumen inicial; V₂= Volumen final



Perfil de temperatura óptima de hibridación para el Primer DALP 06

ANEXO 06

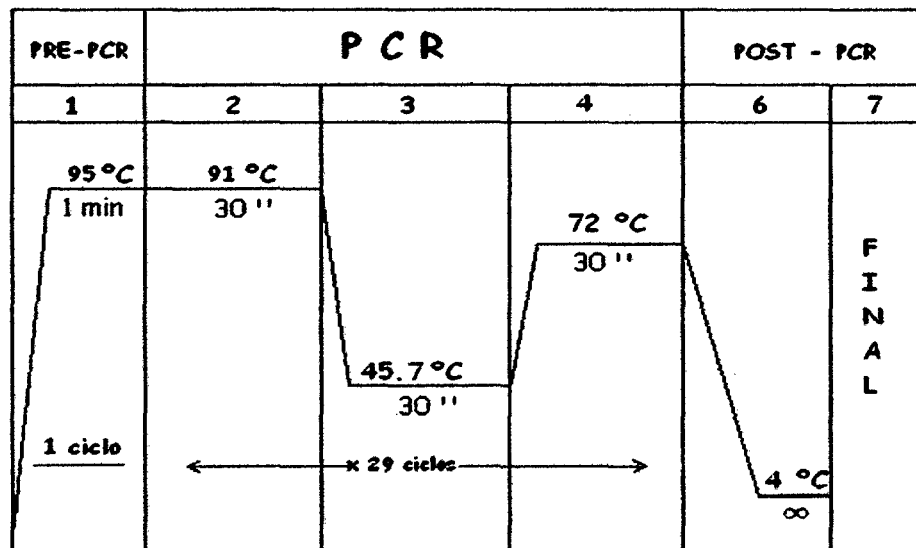
CONDICIONES ÓPTIMAS PARA LA AMPLIFICACIÓN DE ADN DE *Mauritia*

flexuosa L. f. USANDO PRIMER DALP07 (Desmarais *et al.*, 1998)

PRIMER DALP 07					
Reactivo	C₁	C₂	V₁	Nº muestras	V₂
Buffer	5X	1X	5	12,5	62,50
Mg Cl2	25mM	3.1mM	3,1	12,5	38,75
DALP P3	10uM	0,8uM	2	12,5	25,00
DALP PR	10uM	0,8uM	2	12,5	25,00
dNTP's	10mM	0,3mM	0,75	12,5	9,38
Taq	5u/ul	0,075u/ul	0,375	12,5	4,69
PRE MIX TOTAL			13,23		165,31

Agua mili-Q	9,77
DNA	2
Volumen total	25ul

Legenda: C₁= Concentración inicial; C₂= Concentración final;
V₁= Volumen inicial; V₂= Volumen final



Perfil de temperatura óptima de hibridación para el Primer DALP 07

ANEXO 07

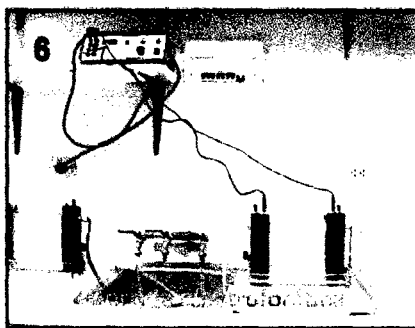
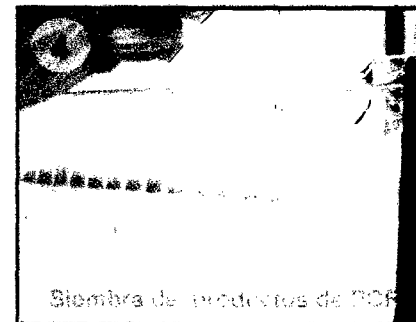
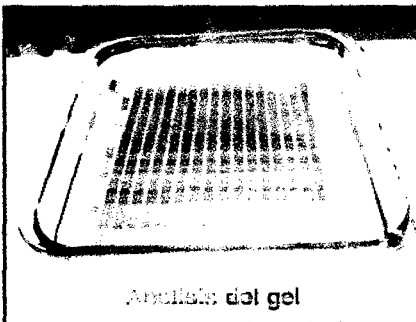
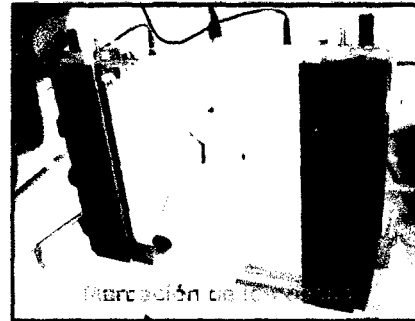
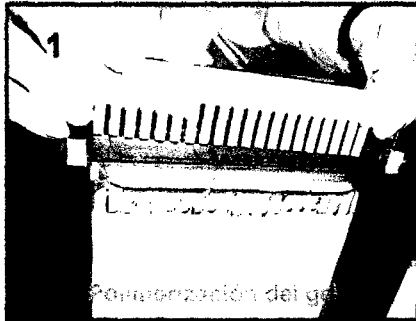
PREPARACIÓN DEL GEL DE POLIACRILAMIDA AL 6%

Reactivo	Conc. Inicial	Conc. Final	Vol. Gel
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 (gelificación): 1.5 hora
- ❖ Quitar los peines moldes una vez el gel haya polimerizado.
- ❖ Lavar los pozos resultantes en el gel con agua destilada utilizando una jeringa. Repetir el paso tres veces.

ANEXO 08

ELECTROFORESIS DE LOS PRODUCTOS AMPLIFICADOS VÍA DALP – PCR Y REVELADO EN GEL DE POLIACRILAMIDA



Anexo 09

TINCIÓN ARGÉNTICA 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 1.5 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.

Los geles se preservan en medio de 02 hojas de papel celofán previamente humedecido con agua y colocados sobre un soporte de vidrio. Se deja secar a temperatura ambiente.