

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA AMAZONÍA PERUANA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA DE BIOLOGÍA



**RELACIONES FILOGENÉTICAS DEL GÉNERO *Plukenetia*  
Linnaeus, 1753 (EUPHORBIACEAE) EN LA AMAZONÍA  
PERUANA**

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE  
**BIÓLOGO**

PRESENTADA POR EL BACHILLER  
**ÁNGEL MARTÍN RODRÍGUEZ DEL CASTILLO**

**IQUITOS – PERÚ**

**2009**

DONADO POR:  
*Rodríguez Del Castillo Ángel M.*  
*Iquitos, 18 de 05 de 2011*

*A Dios. A mis padres Diana y Rodolfo que me brindan lo mejor de ellos y en el camino me guían permanentemente con amor y empeño. A mis hermanos Luis Carlos y Corina. A toda mi familia de quienes recibo tanto cariño, por todas las experiencias compartidas.*

*Ángel Martín*

## AGRADECIMIENTO

Al Instituto de Investigaciones de la Amazonia Peruana -IIAP y al Programa de Ecosistemas Terrestres – PET Región San Martín por la beca de estudios concedida y el financiamiento para la realización de la presente investigación.

A la Dra. Carmen Rosa García Dávila orientadora de esta investigación, por todos los conocimientos brindados, por la paciencia, empeño, dedicación y apoyo permanente en la realización de la tesis.

Al Dr. Jean-François Renno, de quien su experiencia y orientación han sido decisivas en el desarrollo de la tesis.

A Diana Castro y Werner Chota, por la amistad, el apoyo y las enseñanzas desde el inicio en la adquisición de destrezas en el laboratorio.

A la Dra. Lynn Gillespie, por el aporte a la tesis con los múltiples artículos gentilmente enviados y los consejos brindados.

Al Dr. Dennis del Castillo, por la motivación e interés mostrado en esta investigación.

Al Blgo. Kember Mejía por la orientación y apoyo brindados.

Al Ing. Danter Cachique y al Ing. Guillermo Vásquez, por el apoyo constante en la consecución de las metas y a los amigos que trabajaron en equipo con ellos en el IIAP-San Martín, especialmente a Vanessa y Manuel.

Al Dr. Víctor Sotero por los consejos y amistad brindada.

A Ricardo Zárate y a Juan Ruiz, quienes colaboraron instruyendo en la colecta, identificación y preservación de muestras.

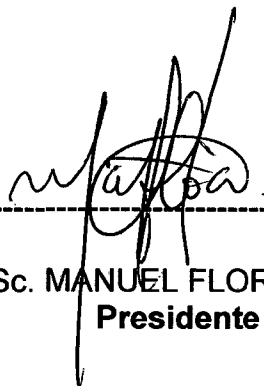
A la señora Hilda Rivera, por la amabilidad y ayuda constante en los muestreos en la localidad de Pucaurquillo.

A Juan Pablo Torrico, Fernando Carvajal y Óscar Pineda, por los consejos en la práctica de laboratorio y la amistad mostrada.

A Mike Corazón amigo y compañero en todas las experiencias en el proyecto Sachainchi.

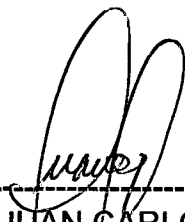
A mis amigos del laboratorio: Javier, Adriana, Giancarlo, Frank, Jorge, Evelyn, Kevin, Claudia, Liliana, Karin, Carlos Andrés, Erika, Martha, Mara, Pedro, Antonio, Adelita, Nydia, Juan Carlos, Dorian, Joahan, José Luis, Elías, Gabriel.

**JURADO EXAMINADOR Y CALIFICADOR**



Blgo. MSc. MANUEL FLORES ARÉVALO  
**Presidente**

Blgo. MSc. ALBERTO GARCÍA  
**Miembro**



Blgo MSc. JUAN CARLOS CASTRO G.  
**Miembro**



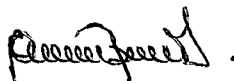
Dra. CARMEN ROSA GARCÍA DÁVILA  
**Asesora**



Dr. JEAN-FRANÇOIS RENNO  
**Co-asesor parte genética**



Blgo. KEMBER MATEO MEJÍA CARHUANCA  
**Co-asesor parte botánica**



Blga. ADRIANA DEL PILAR BURGA CABRERA  
**Co-asesora parte botánica**

## ÍNDICE DE CONTENIDO

DEDICATORIA.....	2
AGRADECIMIENTO.....	3
JURADO EXAMINADOR Y CALIFICADOR.....	5
ÍNDICE DE CONTENIDO.....	6
ÍNDICE DE TABLAS.....	8
ÍNDICE DE FIGURAS.....	9
LISTA DE ABREVIATURAS.....	11
I. INTRODUCCIÓN.....	12
II. REVISIÓN LITERARIA.....	14
2.1. Ubicación sistemática.....	14
2.2. Descripción taxonómica del género <i>Plukenetia</i> .....	14
2.3. Distribución.....	15
2.4. Ecología.....	16
2.5. Utilización.....	16
2.6. Contenido nutricional.....	17
2.7. Marcadores moleculares.....	18
2.8. Non Anchored Inter Simple Sequence Repeat (ISSR).....	19
III MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
3.1. Lugares de muestreo.....	23
3.2. Obtención del material biológico.....	24
3.3. Área de trabajo.....	24
3.4. Herborización e identificación.....	24
3.5. Extracción de DNA usando el método CTAB.....	25
3.6. Amplificación de DNA vía Non Anchored ISSR-PCR (Inter Simple Sequence Repeat – Polymerase Chain Reaction).....	26
3.7. Electroforesis y visualización de los Productos de Amplificación.....	27
3.8. Análisis estadístico.....	27
3.8.1. Análisis Factorial de Correspondencia AFC.....	27
3.8.2. Índice de fijación ( $F_{st}$ ).....	28
3.8.3. Relaciones Interespecíficas.....	29

IV	RESULTADOS	31
	4.1. Identificación botánica.....	31
	4.1.1.Descripción de las especies identificadas.....	31
	4.1.2.Caracteres diagnósticos de los diferentes grupos de <i>Plukenetia</i> .....	47
	4.2. Caracterización molecular.....	50
	4.2.1. Polimorfismo de ISSR.....	50
	4.2.2. Genotipos totales.....	54
	4.2.3. Análisis Factorial de Correspondencia (AFC).....	56
	4.2.4. Índice de fijación $F_{st}$ .....	58
	4.2.5. Relaciones interespecíficas.....	58
V.	DISCUSIÓN.....	62
	5.1. Identificación botánica.....	63
	5.2 identificación molecular y relaciones filogenéticas.....	67
VI	CONCLUSIONES.....	71
VI	RECOMENDACIONES.....	72
VI	RESUMEN.....	73
IX	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	75
	ANEXOS.....	86

## ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
<b>Tabla 01.-</b> Número y secuencia de primers ISSR utilizados en el análisis de las relaciones filogenéticas entre las especies Amazónicas del genero <i>Plukenetia</i> .	..... 27
<b>Tabla 02.-</b> Clasificación de Valores de $F_{st}$ (Tomado de Hartl & Clark, 1997)	..... 29
<b>Tabla 03.-</b> Principales caracteres diagnósticos de las especies peruanas del genero <i>Plukenetia</i>	..... 48
<b>Tabla 04.-</b> Diversidad genética del género <i>Plukenetia</i> por marcador ISSR usado	..... 50
<b>Tabla 05.-</b> Genotipos totales encontrados en los seis grupos del género <i>Plukenetia</i> analizados con tres marcadores ISSR	..... 54
<b>Tabla 06.-</b> Individuos de <i>Plukenetia</i> que contribuyeron mas a la inercia en los tres factores de correspondencia	..... 57
<b>Tabla 07.-</b> Estimación del $F_{st}$ para los seis grupos de <i>Plukenetia</i>	..... 58
<b>Tabla 08.-</b> Distancias genéticas según Reynolds, Weir & Cockerham (1983) para los seis grupos de <i>Plukenetia</i>	..... 60



## ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
<b>Figura 01:</b> Distribución del género <i>Plukenetia</i> en el mundo	16
<b>Figura 02:</b> Mapa del Perú mostrando las localidades de colecta de las especies del género <i>Plukenetia</i>	23
<b>Figura 03:</b> A) Exsicata de <i>Plukenetia polyadenia</i> depositada en el Herbarium Amazonense de la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana; B) Hojas de <i>P. polyadenia</i> ; C) Glándulas basilaminares en <i>P. polyadenia</i>	33
<b>Figura 04</b> Distribución de <i>Plukenetia polyadenia</i>	34
<b>Figura 05</b> A) Exsicata de <i>Plukenetia lorentensis</i> depositada en el Herbarium Amazonense de la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana; B) Hojas y fruto de <i>P. lorentensis</i> ; C) Glándulas basilaminares en <i>P. lorentensis</i>	36
<b>Figura 06</b> Distribución de <i>Plukenetia lorentensis</i>	37
<b>Figura 07</b> A) Exsicata de <i>Plukenetia brachybotrya</i> depositada en el Herbarium Amazonense de la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana; B) Hojas y fruto de <i>P. brachybotrya</i> ; C) Glándulas basilaminares en <i>P. brachybotrya</i>	39
<b>Figura 08</b> Distribución de <i>Plukenetia brachybotrya</i>	40
<b>Figura 09</b> A) Exsicata de <i>Plukenetia volubilis</i> ecotipo San Martín depositada en el Herbarium Amazonense de la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana; B) Hojas, inflorescencia y fruto de <i>P.volubilis</i> ecotipo San Martín; C) Glándulas basilaminares en <i>P. volubilis</i> ecotipo San Martín	42
<b>Figura 10</b> Distribución de <i>Plukenetia volubilis</i>	43
<b>Figura 11:</b> A) Exsicata de <i>Plukenetia volubilis</i> ecotipo Amazonas depositada en el Herbarium Amazonense de la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana; B) Hojas y fruto de <i>P.volubilis</i> ecotipo Amazonas; C) Glándulas basilaminares en <i>P. volubilis</i> ecotipo Amazonas.	44
<b>Figura 12</b> Distribución de <i>Plukenetia volubilis</i> ecotipo Amazonas en el Perú	45

<b>Figura 13:</b>	A) Exsicata de <i>Plukenetia volubilis</i> ecotipo Cusco depositada en el Herbarium Amazonense de la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana; B) Hojas y fruto de <i>P.volubilis</i> ecotipo Cusco C) Glándulas basilaminares en <i>P. volubilis</i> ecotipo Cusco.	46
<b>Figura 14:</b>	Distribución de <i>Plukenetia volubilis</i> ecotipo Amazonas en el Perú	47
<b>Figura 15:</b>	Semillas de las especies y ecotipos amazónicos del género <i>Plukenetia</i> estudiados	49
<b>Figura 16:</b>	<b>A:</b> Geles de agarosa al 2% mostrando productos de amplificación con primer CAA; <b>B:</b> Gel de poliacrilamida al 6% mostrando los productos de amplificación de los seis grupos de <i>Plukenetia</i> con el primer CAA	51
<b>Figura 17:</b>	<b>A:</b> Geles de agarosa al 2% mostrando productos de amplificación con primer CAG; <b>B:</b> Gel de poliacrilamida al 6% mostrando los productos de amplificación de los seis grupos de <i>Plukenetia</i> con el primer CAG	52
<b>Figura 18:</b>	<b>A:</b> Geles de agarosa al 2% mostrando productos de amplificación con primer GACA; <b>B:</b> Gel de poliacrilamida al 6% mostrando los productos de amplificación de los seis grupos de <i>Plukenetia</i> con el primer GACA	53
<b>Figura 19:</b>	Proyección gráfica de los resultados del AFC con los ejes 1, 3 y 4 para los individuos de los seis grupos en estudio de <i>Plukenetia</i> .	56
<b>Figura 20:</b>	Dendograma elaborado a partir de los perfiles genéticos con el método de Wagner (Eck & Dayhoff, 1966; Kluge & Farris, 1969) de los seis grupos de <i>Plukenetia</i> estudiados	59
<b>Figura 21:</b>	Dendograma de los seis grupo del género <i>Plukenetia</i> elaborado mediante el método UPGMA a partir de los datos de distancia genética de Reynolds, Weir & Cockerham (1983).	61

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>ADN</b>	: Ácido desoxiribonucleico.
<b>AFC</b>	Análisis Factorial de Correspondencia.
<b>F<sub>st</sub></b>	: Diferenciación entre poblaciones.
<b>dNTP`s</b>	: Desoxinucleótidos trifosfatos.
<b>EDTA</b>	: Ácido Etileno Diamino Tetraacético.
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	: Cloruro de Magnesio.
<b>NaCl</b>	: Cloruro de Sodio.
<b>PCR</b>	: Reacción en Cadena de la Polimerasa.
<b>pH</b>	: Potencial de Hidrogeno.
<b>TBE</b>	: Tris Borato EDTA.
<b>Tris Base</b>	: Tris Hidroximetil Amino Metano.
<b>Vis/UV</b>	: Luz ultravioleta visible
<b>CTAB</b>	: Bromuro de Cetil Trimetil Amonio
<b>H<sub>2</sub>O mili-Q</b>	: Agua ultrapura: destilada, ultrafiltrada, autoclavada.
<b>Taq</b>	: <i>Thermus aquaticus</i> Enzima termoestable.
<b>FC</b>	: Factor de Correspondencia
<b>DALP</b>	: Amplificación Directa de Polimorfismo de Longitud
<b>AFLP</b>	: Polimorfismo de Longitud de Fragmentos Amplificados
<b>RAPD</b>	: Polimorfismo de ADN Amplificado al Azar
<b>ISSR</b>	: Inter Secuencias Simples Repetidas
<b>RFLP</b>	: Polimorfismo de Longitud de Fragmentos de Restricción
<b>ADD</b>	: Dominante Amplificado Arbitrariamente

## I.-INTRODUCCIÓN

La Amazonía peruana tiene una superficie aproximada de 770 000 km<sup>2</sup> (Kalliola, 1993), y su elevada riqueza de especies, constituye desde el punto de vista florístico, su cualidad mas relevante (Gentry, 1993). La diversidad de pisos ecológicos presentes en la Amazonía peruana, ha permitido a través de los milenios, la domesticación de numerosas especies de plantas nativas con una alta variabilidad genética (Zapata, 2001). La impresionante diversidad biológica hace que muchas de estas especies no hayan sido estudiadas en profundidad, desconociéndose sus características biológicas, genéticas y fitoquímicas. Lo que impide conocer su real valor agregado, con las consecuentes pérdidas económicas.

El Perú es un país deficitario en la producción de grasas y aceites, más del 50 % de su demanda debe ser satisfecha con la importación de diferentes grasas vegetales, a esto se agrega que el consumo nacional per cápita de lípidos vegetales es inferior a los niveles mínimos recomendados por la Organización Mundial de la Salud, diferentes organismos internacionales e investigadores vinculados con la alimentación y la salud (Anaya, 2003). En este sentido, el “sacha inchi” *Plukenetia volubilis* (Linnaeus, 1753), es una planta nativa de la Amazonía peruana, que presenta en sus semillas: proteínas, ácidos grasos esenciales (omegas 3, 6, y 9) y vitamina E (tocoferoles y tocotrienoles) en cantidades significativamente elevadas con respecto a las semillas de otras oleaginosas (maní, palma, soya, maíz, colza y girasol).

El valor del “sacha inchi” radica no sólo en los aspectos alimenticios, culturales e históricos, sino también en su rentabilidad económica. Siendo un cultivo con potencial rendimiento económico, debido principalmente a sus

posibilidades de industrialización (Arévalo, 1995; Incagro, 2006). Debido a esto actualmente el sachá inchi viene siendo intensamente cultivado en parcelas de productores principalmente de la región de San Martín; observándose tanto una alta variabilidad genética y morfológica, como fitoquímica (diferentes concentraciones de ácidos grasos esenciales). Esto puede deberse a que en el proceso de expansión del cultivo se han llegado a confundir especies emparentadas del género *Plukenetia*. Este género presenta cuatro especies taxonómicas reportadas para la Amazonía peruana, las cuales fueron descritas en función a sus características morfológicas. Revisiones morfológicas de algunas muestras biológicas depositadas en el Herbarium Amazonense, muestran cierta sobreposición en algunos de los caracteres diagnósticos de estas especies, lo que podría dificultar su correcta identificación. En este sentido los marcadores moleculares constituyen poderosas herramientas para esclarecer cuestiones no resueltas mediante la taxonomía morfológica. Así, datos moleculares de ADN han sido utilizados para corroborar la sistemática morfológica o para cuestionarla (Gillespie, 1993; Judd *et al.* 1999). En este sentido, el presente estudio, tuvo como objetivo contribuir a la delimitación taxonómica de las diferentes especies del género a través del establecimiento de las relaciones filogenéticas del género *Plukenetia* en la Amazonía peruana mediante identificación con claves taxonómicas y el empleo de la técnica molecular ISSR, produciendo información que sirva de base a futuros planes de manejo y mejoramiento genético.

## II. REVISION LITERARIA

### 2.1 Ubicación sistemática

Según Ayala (1999) y Gillespie (1993, 1997) presentan la siguiente clasificación:

Reino	:	Plantae
Subreino	:	Fanerogama
Clase	:	Magnoliopsida (Angiospermae)
Subclase	:	Rosidae
Orden	:	Euphorbiales
Familia	:	Euphorbiaceae
Subfamilia	:	Alcalyphoideae
Tribu	:	Plukenetieae
Subtribu	:	Plukenetiinae
Género	:	<i>Plukenetia</i> (Linnaeus, 1753)
Especies	:	<i>Plukenetia volubilis</i> (Linnaeus, 1753)
		<i>Plukenetia brachybotrya</i> (Müller. Arg., 1865)
		<i>Plukenetia polyadenia</i> (Müller. Arg., 1874)
		<i>Plukenetia lorentensis</i> (Ule, 1908)

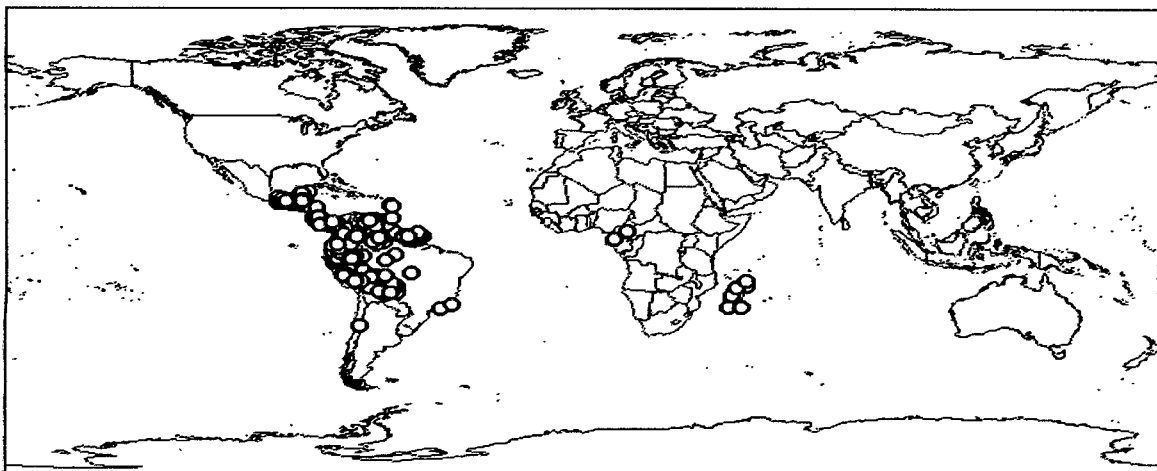
### 2.2 Descripción taxonómica del género *Plukenetia* Linnaeus, 1753

El género *Plukenetia* L. Pertenece a la familia Euphorbiaceae, se caracteriza por no presentar látex y agrupar diferentes especies de lianas monoicas o raramente dioicas. Las plantas presentan hojas simples, alternas y pecioladas; con estípulas pequeñas; de lámina foliar pennada o palmadamente venada, margen subentero hasta aserrado, con presencia característica de uno

o varios pares de glándulas lisas laminares presentes cerca de la base sobre la superficie adaxial de la hoja. Las inflorescencias son racemosas, de posición axilar o terminal sobre cortos vástagos, bisexual con flor(es) pistilada(s) en la base y flores estaminadas encima de cimas condensadas o menos frecuentemente unisexual; brácteas triangulares y pequeñas. Las flores estaminadas son pediceladas; sépalos de 4 a 5; corola ausente; estambres de 15 a 40 y libres; filamentos cortos a elongados o con anteras sésiles; mientras que las flores pistiladas son pediceladas con 4 sépalos; corola ausente; ovario de 4 lóculos; con estilos parcialmente a completamente connados. El fruto es comúnmente tetragonal (raramente 5 – 6 particiones) capsulado o baya, y fuertemente surcada de manera longitudinal, subglobosa hasta profundamente lobado. Asimismo las semillas son subglobosas, ovoides o lenticular y a menudo lateralmente comprimidos, carunculada, y de superficie lisa o áspera. (Gillespie & Armbruster, 1997; Gentry, 1993; Mejia, 1998).

### 2.3. Distribución

*Plukenetia* L. es un género pantropical (Fig. 01), posee 19 especies entre sogas y lianas, este género incluye 12 especies neotropicales, y siete en el viejo mundo: una especie en el Asia, tres en el África y tres en Madagascar, (Gillespie, 1993; 2007). En América del Sur han sido registradas en todos los países de la cuenca amazónica y las Guyanas diferentes especies del género *Plukenetia*. Para el Perú se tienen reportadas la presencia de por lo menos cuatro especies de este género: *Plukenetia brachybotrya*, *P. lorentensis*, *P. polyadenia* y *P. volúbilis*; todas estas especies fueron reportadas para los alrededores de Iquitos (Gillespie, 1993; Mobot, 2007; Vásquez, 1997).



**Figura 01.-** Distribución del género *Plukenetia* en el mundo.

#### **2.4. Ecología:**

El género *Plukenetia* se desarrolla en diversos pisos ecológicos desde el pie de montaña andino a los bosques más bajos y húmedos de la Amazonía; Habitan diferentes altitudes: *Plukenetia brachybotrya* y *P. verrucosa* fueron reportadas hasta los 900 m.s.n.m, *P. volubilis* incluso fue reportada sobre los 900 m.s.n.m., en tanto que *P. lorentensis* hasta los 700 m.s.n.m y *P. polyadenia* es una liana del dosel de bosques húmedos de la selva baja; algunas especies tales como *P. brachybotrya* y *P. volubilis* son frecuentes en áreas disturbadas (Gillespie, 1993; Gillespie & Armbruster, 1997).

#### **2.5. Utilización:**

*Plukenetia volubilis* "sachainchi" ha sido cultivado en el Perú incluso en la época prehispánica; este vegetal viene siendo utilizado desde la antigüedad para la alimentación de las poblaciones rurales, nativas y mestizas de la alta y baja Amazonía peruana, encontrándose semillas y representaciones cerámicas. Para la alimentación se aprovecha principalmente las semillas y hojas cocidas,



tostadas, en mantequilla, o como ingrediente de platos típicos. Esta planta no sólo es aprovechada en alimentación, sino también en cosmetología, medicina, fabricación de aceite, como combustible e insecticida, aunque el conocimiento de estos usos aun es poco y reducido, y de tipo más bien artesanal. Recientemente se viene ensayando la preparación de leche, queso, pastas, pan, confites, carnes vegetales, etc. y se investiga el potencial como nutracéutico. De manera mas aislada y solamente entre comunidades indígenas del bajo Amazonas también se ha observado el consumo de *Plukenetia polyadenia* (Arévalo, 1995; Pascual, 2000; Brack, 1999; Gillespie & Armbruster, 1997; Mejia, 1998; Proamazonia, 2006).

## **2.6. Contenido nutricional:**

En 1980 la Universidad de Cornell en EUA, demostró que las semillas de *Plukenetia volubilis*, sachainchi, tienen alto contenido proteico (33%) y graso (49%), con clara ventaja sobre la soya, maní y otras semillas oleaginosas. La torta y harina proteica de *P. volubilis* además del alto contenido de proteínas, posee la más alta digestibilidad, es una de las más completas en aminoácidos esenciales y no esenciales, y contienen altos niveles de muchos de ellos; además de poseer un interesante contenido de isoflavonas, fitoestrógenos y saponinas. Actualmente viene siendo estudiada por sus propiedades anticancerígenas, sus funciones antioxidantes, y su rol en la mejoría de la mineralización ósea (Anaya, 2003; Manco, 2006).

En comparación a los aceites de todas las semillas oleaginosas utilizadas en el mundo, para consumo humano, el "sacha inchi" es el más rico en ácidos grasos insaturados, llega hasta 93,6%, además contiene antioxidantes que

permiten la conservación del aceite y aportan beneficios al organismo humano. Este aceite es el de mayor contenido de poliinsaturados, en promedio está compuesto de: 48,60% de ácido graso esencial alfa linolénico Omega 3, 36,80% de ácido graso esencial linoleico Omega 6 y 8,28% de ácido oleico Omega 9 y tiene el más bajo contenido de ácidos grasos saturados, 6,39% en promedio, 3,85% de palmítico y 2,54% de esteárico. La digestibilidad del aceite es mayor a la de otros aceites vegetales, llegando hasta 97%. Una de los más preciados beneficios de este aceite es el alto contenido de ácido graso esencial alfa linoleico (omega 3), el cual es muy escaso en la naturaleza, este ácido graso es elemental, pues el organismo humano no lo puede sintetizar a partir de otros alimentos. El omega 3 es necesario para cumplir funciones fisiológicas vitales, siendo fundamental para mantener la salud (Hamaker *et al.*, 1992; García, 2002; Guillén *et al.*, 2003).

## **2.7. Marcadores Moleculares**

Actualmente los marcadores moleculares son herramientas fundamentales para el estudio de la variabilidad genética, proporcionando información biológica en todas las áreas, incluyendo la medicina forense, bioconservación, sistemática y mejoramiento genético (Matioli, 2001; Kothe, 1998). Esto debido principalmente a que diversas técnicas moleculares están hoy disponibles para la detección de polimorfismo genético es decir de variabilidad genética a nivel de secuencia de DNA (Ferreira & Gratapaglia, 1998).

El conocimiento de la variabilidad genética nos permite establecer las relaciones filogenéticas y filogeográficas que nos ayuden a comprender la

historia evolutiva de los organismos; pudiéndose determinar las relaciones evolutivas a virtualmente todos los niveles de clasificación de los organismos: reinos, phyla, clases, familias, géneros, especies, e intraespecíficamente a nivel de poblaciones (Nei, 1996). Además de ser necesaria para comprender la evolución, la genética molecular puede ser usada como instrumento de investigación por ecólogos y sistematas en diversas ramas, como por ejemplo, para verificar las afinidades y los límites entre las especies (Judd *et al.* 1999).

## **2.8. Non Anchored Inter Simple Sequence Repeat (ISSR)**

Debido a la fácil accesibilidad de secuencias en el GENE BANK, que hace posible la obtención de primers para trabajos con marcadores moleculares, y a la simplificación y automatización de los procesos de PCR (Reacción en cadena de la polimerasa), hoy en día se registra un aumento en las técnicas de marcadores moleculares basados en PCR; como por ejemplo RAPD, secuenciamiento nucleotídico, AFLP, microsatélites, ISSR, DALP etc.; así también, con la finalidad de aumentar su sensibilidad en la detección de polimorfismo, es frecuente encontrar combinaciones de algunas de estas técnicas con otras como el RFLP.

La facilidad con la que los marcadores “dominantes amplificados arbitrariamente” (Arbitrarily Amplified Dominant, AAD), como RAPD, AFLP e ISSR, pueden ser usados para generar abundante cantidad de datos, permite su rápida aplicación dirigida a un diverso rango de cuestiones biológicas. La relativa facilidad de desarrollo y generación de marcadores AAD han hecho de ellos un punto de partida para muchos estudios moleculares en filogenética y sistemática, particularmente de taxa para los cuales ninguna otra información

genética esta disponible en la literatura científica. La técnica molecular ISSR es descrita así como una poderosa técnica para valorar diversidad genética de especies relacionadas estrechamente y para detectar similitudes entre y dentro de especies (Busell, 2005; Shi *et al.*, 2006).

El ISSR (secuencia entre repeticiones simples), es una técnica que se basa en la amplificación mediante PCR de las secuencias ubicadas entre dos microsatélites. Este marcador utiliza primers arbitrarios, que gracias a la conocida abundancia de secuencias repetitivas esparcidas por todo el genoma, identifica múltiples locus. Esta técnica resulta ser ventajosa porque no se requiere ninguna información genómica anterior para su uso y se encuentra estable a través de una amplia gama de parámetros de PCR; la técnica ISSR-PCR combina dos de las cualidades requeridas para análisis de rutina: bajo costo y rápido procesamiento con requerimiento mínimo de equipamiento (Bornet & Branchard, 2001; Ipgri & Cornell University, 2003).

Los marcadores ISSR han sido desarrollados a partir de las repeticiones de microsatélites, mediante el anclaje de cebadores específicos (primers específicos) para dichas repeticiones. Estos marcadores poseen características que los hacen atractivos para la diferenciación varietal de diferentes especies vegetales; de esta manera ISSR - PCR proporciona una nueva aproximación de fingerprinting aplicable para las comparaciones taxonómicas y filogenéticas y como herramienta de mapeo en una amplia diversidad de organismos. (Zietkiewicz *et al.*, 1994; González-Guzmán *et al.*, 2006). Investigaciones previas han demostrado que el análisis de ISSR detecta generalmente un alto nivel del polimorfismo en comparación con las detecciones del RFLP (polimorfismo de la longitud del fragmento de restricción) o el RAPD (análisis de

polimorfismo de DNA amplificados al azar) (Godwin *et al.*, 1997; Bahulikar *et al.*, 2004; Pradeep *et al.*, 2001).

Numerosos estudios previos han mostrado que los marcadores ISSR son apropiados para establecer inferencias sobre las relaciones interespecíficas. Así, Xu & Su (2001) emplearon exitosamente ISSR para analizar las relaciones de los miembros del complejo de *Amaranthus hybridus* (Amaranthaceae) e investigar las variaciones intra e interespecíficas de *Amaranthus* y sus supuestos parientes silvestres, lográndose establecer los límites genéticos entre las especies. Los marcadores ISSR también fueron empleados exitosamente para evaluar relaciones interespecíficas de 20 especies y variedades del género *Lycoris* (Amaryllidaceae) Shi *et al.* (2006). Así mismo Chennaoui-Kourda *et al.* (2007) utilizaron exitosamente ocho primers ISSR en la generación de un total de 96 marcadores polimórficos que revelaron alto polimorfismo en nueve especies de los géneros *Sulla* y *Hedysarum*. Liu y Wendel en 2001 estudiaron la aplicabilidad de polimorfismo ISSR en el género *Gossypium* (Malvaceae), reportando que los patrones de huellas son altamente hereditarios y el uso de la técnica es un sistema fácil e informativo para revelar variaciones inter e intraespecíficas. El polimorfismo ISSR también ha sido utilizado para determinar diversidad genética y relaciones filogenéticas en *Oryza* (Poaceae), usándose 42 genotipos incluyendo 17 especies silvestres, 2 especies cultivadas y 3 géneros relacionados en análisis ISSR. Se determinó que los marcadores de ISSR son útiles en estudios de variaciones del germoplasma cultivado y salvaje de la especie, y para entender las relaciones evolutivas de *Oryza* (Joshi, 2000).

La interpretación de este tipo de marcadores se realiza luego de la electroforesis de los productos amplificados con la lectura en geles de



339

poliacrilamida donde las secuencias repetitivas proporcionan patrones de bandas diferentes (Dávila, 2007); las bandas producidas por ISSR son consideradas como marcadores dominantes con alta reproducibilidad (Fang & Roose, 1997; Nagaoka & Ogihara, 1997). En la interpretación dialéctica de las bandas generadas (presencia/ausencia) la ausencia de una banda puede corresponder a una o más variaciones en las regiones amplificadas (Roux *et al.*, 2007).

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Lugares de muestreo

La colecta de material biológico (Fig. 02) fue realizada basada en la base de datos de Mobot (Jardín Botánico de Missouri, 2007); y de los reportes de Gillespie & Armbruster (1997) y Gillespie (1993): *Plukenetia volubilis* ecotipo San Martín (localidad Shica, región San Martín), *P. volubilis* ecotipo Amazonas (Chirimoto, R. Amazonas), *P. volubilis* ecotipo Cusco (Echarati, R. Cusco), *P. polyadenia* (Pevas, R. Loreto), *P. loretensis* y *P. brachybotrya* (Puerto Almendras, R. Loreto) en estado silvestre.

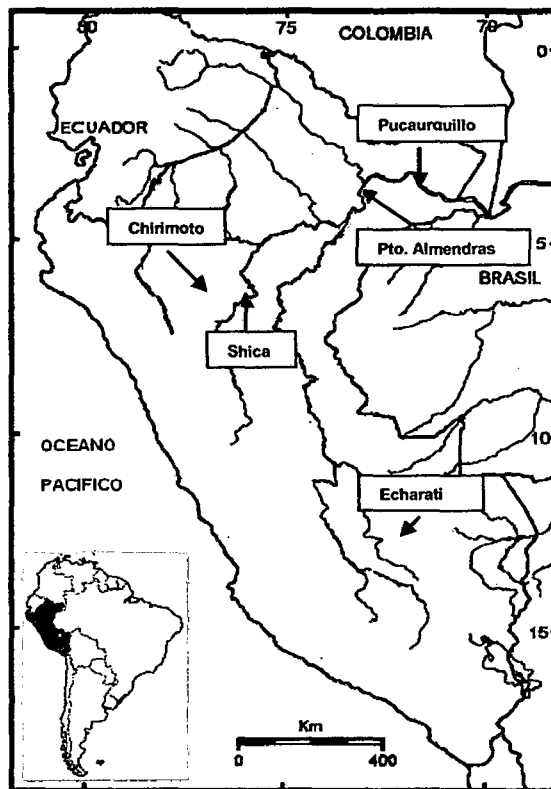


Figura 02.- Mapa del Perú mostrando las localidades de colecta de las especies del género *Plukenetia*.

### **3.2. Obtención del Material Biológico**

En total se colectaron muestras biológicas de 126 individuos (21 por cada grupo morfológico) mediante muestreo aleatorio simple.

El material colectado fue primordios foliares los cuales fueron conservados en tubos de 50 ml tipo Falcon con tapa rosca, conteniendo piedras secantes (Sulfato de Calcio Anhidro). Además fueron colectadas muestras botánicas (hojas, flores y frutos) para identificación taxonómica.

### **3.3. Área de trabajo**

El trabajo se ejecutó en el Laboratorio de Biología y Genética Molecular (LBGM) del Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana (IIAP) ubicado en la Centro de Investigaciones de Quistococha, Carretera Iquitos-Nauta km 4.5, Distrito de San Juan Bautista, Loreto – Perú.

### **3.4. Herborización e identificación:**

Las muestras botánicas fueron transportadas al laboratorio empaquetadas en papel periódico, codificadas y conservadas con solución de alcohol - formol (en proporción 3:2 respectivamente) para posteriormente ser prensada y deshidratada en horno a más o menos 60 °C durante 2 días. Luego de esto se procedió a la limpieza y montaje en cartulinas para confección de excicatas y la identificación mediante claves taxonómicas. Las excicatas fueron depositadas en el Herbarium Amazonense de la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana como muestra testimonio de esta investigación (Certificado de depósito con fecha: 24 de Febrero del 2009).



### **3.5. Extracción de DNA usando el método CTAB.**

La extracción de DNA se realizó a partir de hojas tiernas, mediante el método de extracción CTAB (Doyle & Doyle, 1987) descrito a continuación:

#### **Protocolo de CTAB de Doyle & Doyle (1987)**

- 1.- 100mg de muestra es triturada y mezclada en 1ml del tampón CTAB (CTAB 2%, NaCl 1M, EDTA 0.1M pH 8, Tris Base 0.2M), y 10 $\mu$ l Proteinasa K (0.1mg/ml), el triturado es macerado en baño María (60 °C x 24 horas).
- 2.- La separación del material genómico del resto de tejidos no digeridos es realizado adicionando 1ml de cloroformo y centrifugación a 8 000rpm x 5 minutos. Se recolecta el sobrenadante en un tubo de 1.5 ml.
- 3.- El ADN del sobrenadante es precipitado con isopropanol frío por 2h a -20 °C, seguida de una centrifugación a 13 000rpm x 15 minutos.
- 4.- El pellet de ADN total es lavado con etanol al 70% por dos veces.
- 5.- El pellet debe ser secado por aproximadamente 5 horas y finalmente resuspendido en 30 $\mu$ l de agua ultrapura.

#### **Espectrofotometría del ADN extraído**

La calidad y concentración del ADN extraído fue evaluado mediante el método espectrofotométrico de Maniatis (1989), utilizando un espectrofotómetro UV/Vis, la absorbancia se midió utilizando las longitudes de ondas de 260 y 280 nm. La calidad del ADN extraído fue evaluada en un rango de aceptación entre: 1.7 – 2.2 ( $A_{260}/A_{280}$ ) y la concentración del ADN extraído se determinó con la fórmula: [ $A_{260}$  x FD x 50 $\mu$ g/ $\mu$ l].

## **Electroforesis del DNA extraído**

La verificación del ADN extraído se realizó mediante la observación de bandas de DNA en geles de agarosa 1.0%, teñidos con bromuro de etidio (10mg/ml). La migración del ADN se realizó en una cámara electroforética horizontal a 100 voltios durante 45 minutos, la visualización de los geles y el registro de los mismos fue realizado en un fotodocumentador de luz UV.

### **3.6. Amplificación de DNA vía Non Anchored ISSR-PCR (Inter Simple Sequence Repeat – Polymerase Chain Reaction)**

La técnica ISSR-PCR (Borner & Branchard, 2001) fue realizada en volúmenes finales de 25ul, conteniendo 5ul ADN molde (100ng/ul), 0.38ul de Taq polimerasa (5 U/ul), 5ul Buffer (5X), 5ul MgCl<sub>2</sub> (25mM), 0.25 ó 0.75ul dNTPs (10mM), 2 ul de primer (10μM) y se completó a 25 con agua ultrapura. Las condiciones de temperatura fueron: una desnaturalización inicial a 95°C x 1min., seguida de 27 ciclos consistentes en: desnaturalización (94°C x 1 min.), hibridación (adecuada a cada primer x 1 min.), elongación (72°C x 4 min.) Seguida de una extensión final a 72°C x 7 min. Los primers utilizados son indicados en tabla 01.

**Tabla 01. Primers ISSR utilizados en el análisis de las relaciones filogenéticas entre las especies Amazónicas del género *Plukenetia*.**

Primer	Fuente	Secuencia
CAA <sub>s</sub>	Bornet & Branchard. 2001	CAACAACAACAACAA
CAG <sub>s</sub>	Bornet & Branchard. 2001	CAGCAGCAGCAGCAG
GACA <sub>s</sub>	Bornet & Branchard. 2001	GACAGACAGACAGACA
GATA <sub>s</sub>	Bornet & Branchard. 2001	GATAGATAGATAGATA

### **3.7. Electroforesis y visualización de los Productos de Amplificación:**

El éxito de la amplificación de los productos de PCR fue verificado preliminarmente en geles de agarosa 2% teñidos con bromuro de etidio (10mg/ml) y corridos en cámaras electroforéticas horizontales. La migración de los productos amplificados se realizó a 100 voltios durante 1 hora y el registro del gel se realizó mediante un fotodocumentador con luz UV.

Posteriormente se verificó el polimorfismo entre las muestras en geles de poliacrilamida al 6% (Anexo 01) analizados mediante la observación de la ausencia y presencia de bandas. Las corridas fueron realizadas en cámaras electroforéticas verticales a 300 voltios durante 6 horas. Los geles fueron revelados mediante tinción argéntica de acuerdo al método Rabat (Anexo 04) y visualizados en transluminador de luz blanca.

### **3.8. Análisis estadístico**

#### **3.8.1. Análisis Factorial de Correspondencia AFC**

El Análisis Factorial de Correspondencia, AFC, (Benzécri, 1973; Lebart, Morineau, et Tabard, 1977; Greenacre, 1984; Manella, 1987; Escofier et Pagès,

1990) es un tipo de análisis particularmente bien adaptado para describir las asociaciones entre variables cualitativas de un conjunto de individuos, analiza tablas de contingencia cruzando las modalidades de las variables. Su 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).

El análisis factorial de correspondencia analiza una matriz de ausencia y presencia de bandas por cada locus informativo: 100 (ausencia) y 200 (presencia) para cada primer, para el tratamiento de datos en el Software Genetix versión 4.05.2 (Belkhir *et al.*, 2004).

En este trabajo se realizó un análisis factorial de correspondencia para determinar las diferencias genéticas existentes entre seis grupos del género *Plukenetia*.

### 3.8.2. Índice de fijación ( $F_{st}$ )

El Índice de fijación ( $F_{st}$ ) indica el grado de diferenciación entre los grupos analizados, tomados de dos en dos, explicando los cambios en los perfiles debido a la subdivisión poblacional y deriva genética. Los  $F_{st}$  fueron calculados con ayuda del Software Genetix versión 4.05.2 (2004), utilizando el estimador de Weir & Cockerham (1984) y Weir (1990):

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

Donde:

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

$B_i$  = Componente de la variación dentro de cada grupo

Los valores del  $F_{st}$  varían entre 0 y 1, cuando  $F_{st} = 0$ , los diferentes grupos se comportan como uno solo indicando que no existe divergencia genética entre ellos, cuando el  $F_{st} = 1$ , la estructuración es máxima lo que sugiere que las grupos están fijados. Se establece el siguiente criterio para clasificar el grado de diferenciación entre grupos:

**Tabla 02: Clasificación de 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 la diferencia entre poblaciones multilocus, se 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  $F_{st}$  es mayor a 95 % ( $P < 0.05$ ) en relación a los  $F_{st}$  de las 1000 situaciones sin estructuración.

### **3.8.3. Relaciones interespecíficas**

Se utilizó el Método de Parsimonia de Wagner (Eck & Dayhoff, 1966; Kluge & Farris, 1969) para estimar la filogenia del género *Plukenetia*, con los datos tabulados de los 126 individuos en estudio, en base a una matriz de ausencias (0) y presencias (1). El criterio del método fue el de encontrar el árbol que requiere el número mínimo de cambios, y el cálculo se realizó con los

programas Seqboot, Mix y Consense del paquete de inferencia filogenética PHYLIP versión 3.5c (Felsenstein, 1993), para finalmente elaborar un cladograma.

Se calcularon las distancias entre pares de grupos mediante la fórmula descrita por Reynolds, Weir & Cockerham (1983) que mide la distancia genética a partir de un conjunto de frecuencias en diferentes grupos, mediante el software Genetix versión 4.05.2 (Belkhir. *et al.*, 2004).

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

Donde:

D = Distancia genética.

LN= Logaritmo Neperiano

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

Las relaciones entre las especies y/o grupos en estudio del género *Plukenetia* fueron estimados elaborando un dendograma UPGMA (Unweighted Pair Group Method with the Arithmetic Averaging) usando el programa Gendist (PHYLIP versión 3.5c) a partir de las distancias genéticas calculadas con el estimador de Reynolds, Weir & Cockerham (1983).

Cada grupo fue tratado como una unidad taxonómica operacional y el soporte estadístico fue obtenido de 1000 muestras de bootstrap. Los valores en los dendogramas indican el porcentaje de ocurrencia que los demás cluster (grupos) unidos entre sí presentan en la estructuración mostrada.

La visualización de los dendogramas fue posible mediante el programa TREVIEW (Page, 1996).

## IV. RESULTADOS

### 4.1. Identificación Botánica

La identificación botánica de los grupos estudiados fue realizado mediante la clave propuesta por Gillespie, 1993 para las especies neotropicales del género *Plukenetia* (anexo 01):

#### 4.1.1 Descripción morfológica de las especies identificadas

En base a las claves taxonómicas se identificaron cuatro especies dentro del grupo estudiado: *P. lorentensis*, *P. brachybotrya*, *P. polyadenia*, *Plukenetia volubilis*. Los otros grupos identificados como ecotipos de *Plukenetia volubilis* (Amazonas y Cusco) no pudieron ser identificadas en base a las características morfológicas con precisión a nivel específico. Una breve descripción taxonómica de las especies es presentada a continuación:

#### 1.-*Plukenetia polyadenia* Muell. Arg., 1874

*Plukenetia polyadenia* Muell. Arg. in Mart., Fl. bras., 11(2):334, 1874a. [Tipo: Prov. Maynas, Poeppig 2385 (holotipo, W, foto F32544!, fragmento en FI; isotipo, G!)].

Sinonimia:

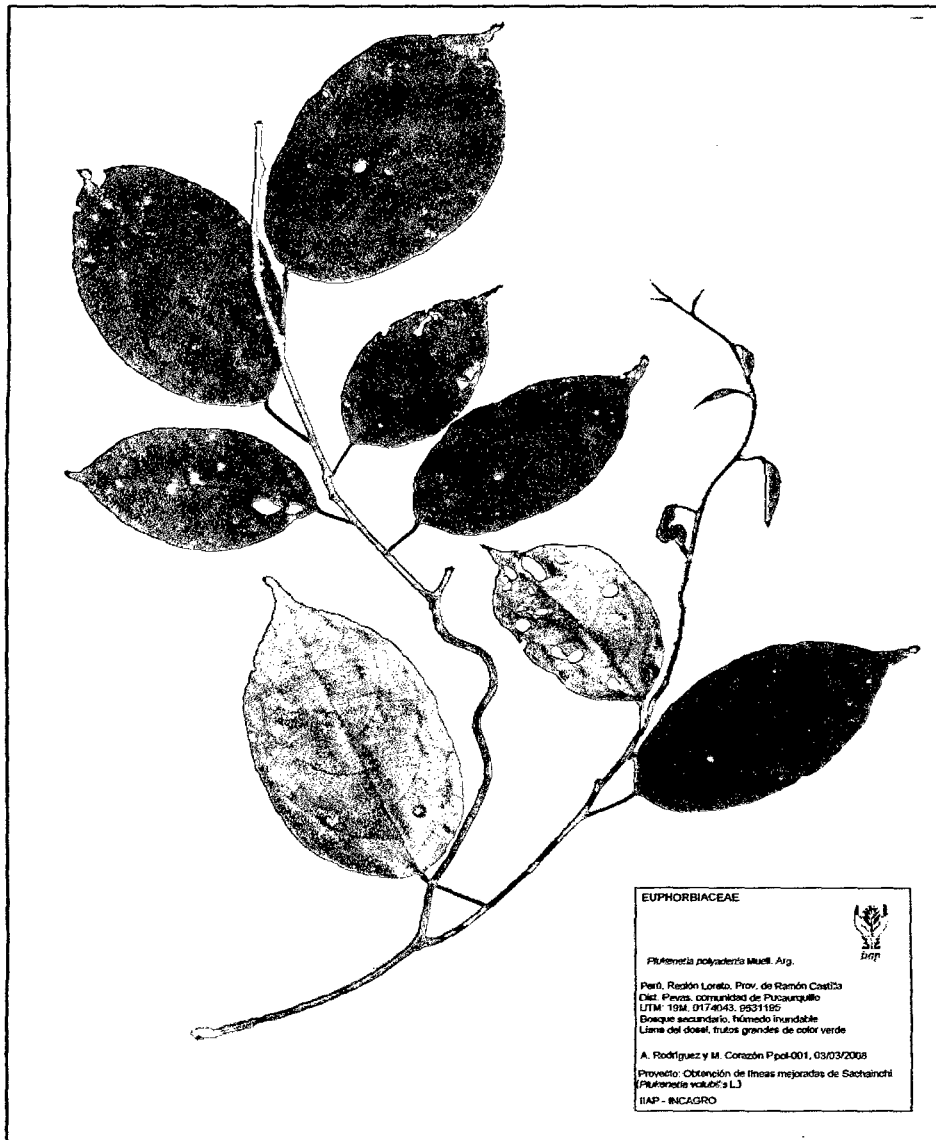
*Elaeophora polyadenia* (Muell. Arg.) Ducke, Arch. Jard. Bot. Río de Janeiro, 5:146, 1930.

*Elaeophora abutifolia* Ducke, Arch. Bot. Río de Janeiro, 4:112, 1925. [Syntypes: Brasil. cerca de Belém, Ducke HJBR 17892 (no visto); Tajaparú R., Ducke HJBR 17893 (isosintipo, P!); Xingu R., Kuhlmann HJBR 17895 (isosyntype, U).]

*Plukenetia abutifolia* (Ducke) Pax & K. Hoffm., Pflanzenfam., ed. 2, 19c: 141, 1931.

**Descripción.** Liana del dosel (Fig. 03). Tallo glabros. Pecíolo 1.5-5 cm de largo, glabros; hoja cartácea a subcoriácea, oval-elíptica, glabra, trinervada en la base, 1 par de glándulas basilaminares. Inflorescencias axilares, racemosas o a veces panícula, usualmente unisexual. Fruto mayor de 8 cm de longitud; baya subglobosa, cuadrangular en secciones transversales, con ángulos quillados, glabro, carnosos, indehiscente, con una amplia protuberancia cónica apical. Semillas ovoides, base redondeada, marrón opaco, superficie áspera.





A

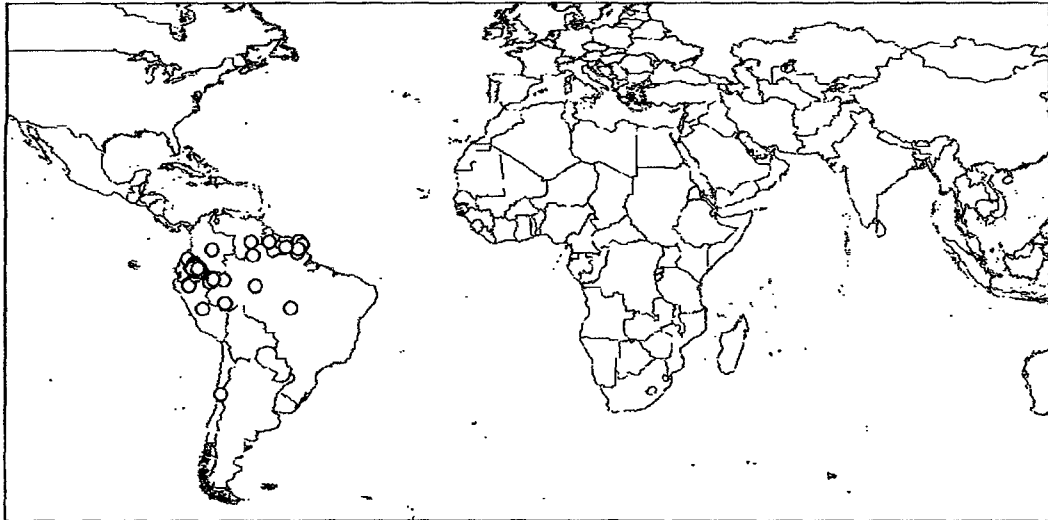


B

C

**Figura 03.-** A) Exsicata de *Plukenetia polyadenia* depositada en el Herbarium Amazonense de la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana; B) Hojas de *P. polyadenia*; C) Glándulas basilaminares en *P. polyadenia*.

**Distribución:** Ampliamente distribuido en las Guayanas, este de Venezuela, y en la cuenca amazónica en Ecuador, Perú, Bolivia y Brasil (figura 04).



**Figura 04.**-Distribución de *Plukenetia polyadenia*.

## **2.- *Plukenetia lorentensis* Ule, 1908**

*Plukenetia lorentensis* Ule, Verh. Bot. Vereins Prov. Brandenburg, 81, 1908.

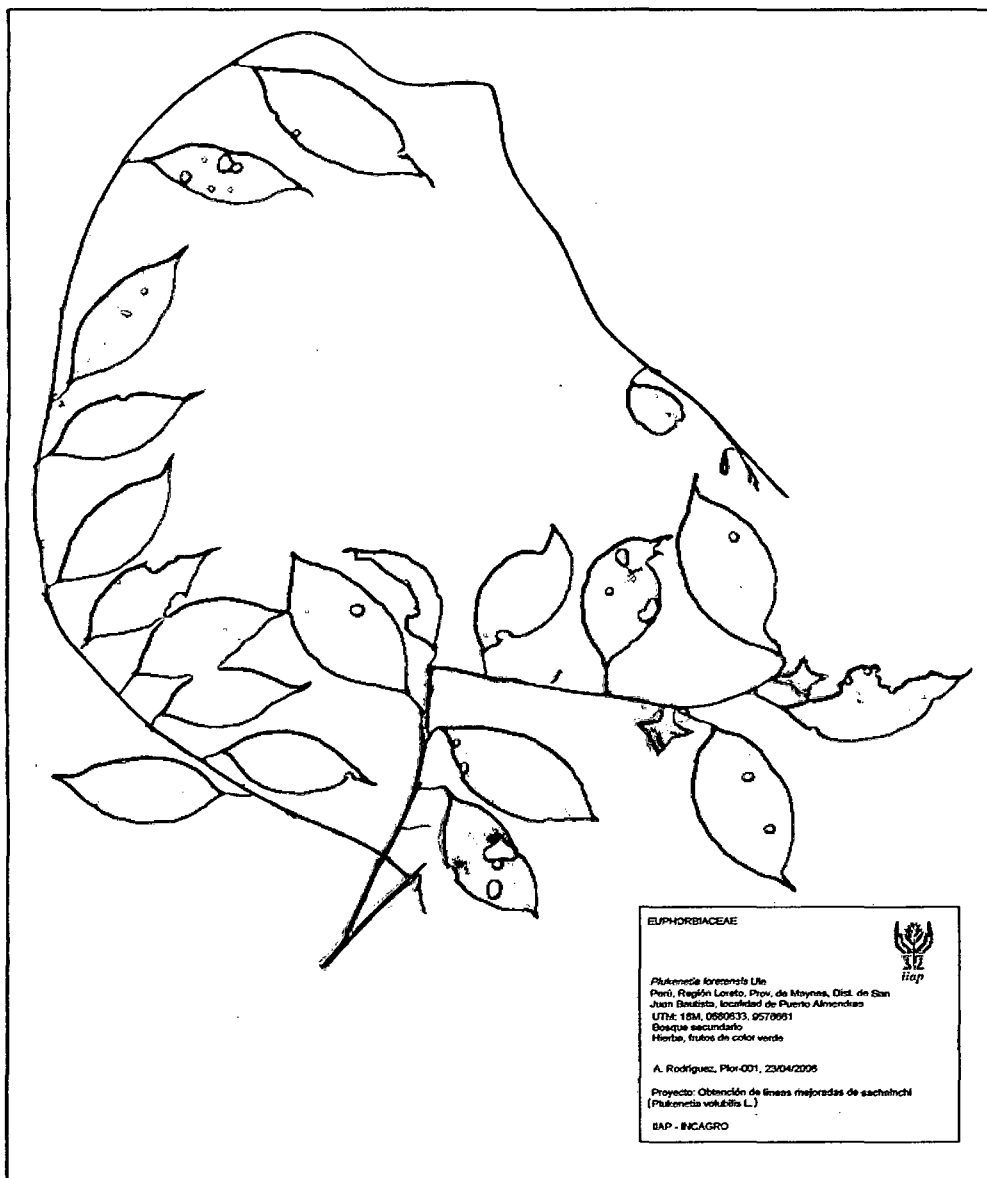
[Tipo: Perú. Loreto. Iquitos, Ule 6837 (isotipo, G!).]

Sinonimia:

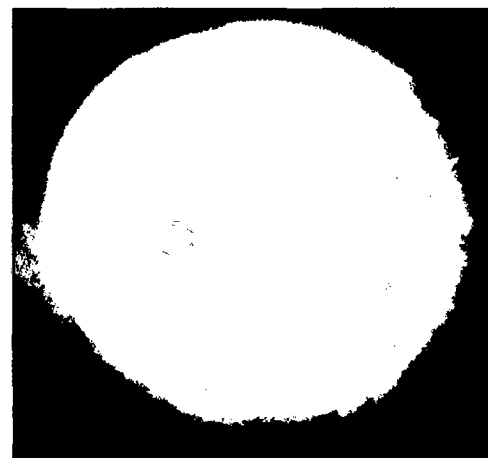
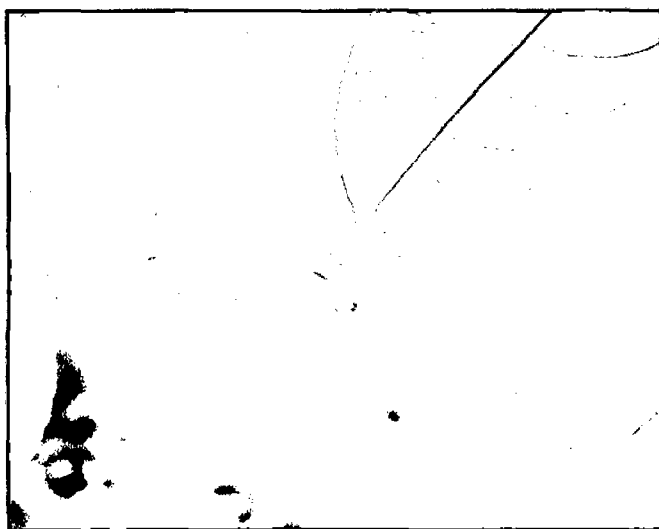
*Apodandra lorentensis* (Ule) Pax & Hoffm., Pflanzenr., IV.174.IX, 68:21, 1919a.

**Descripción.** Soga o liana. Tallos jóvenes, tomentoso, convirtiéndose en poco pubescente (Fig. 05). Pecíolo 0.5-2 cm de largo, tomentoso; hoja cartácea, elíptica, ápice acuminado, base aguda a obtusa, margen serrulado, glabro a escasamente pubescente por encima y por debajo de las principales venas,

pennadamente nervadas; glándulas basilaminares mas de un par o confluyentes en un único par alargado. Cápsula 4-lobada, 0.5-0.7 x 1-1,2 cm, puberulenta, dehiscente, cada carpelo lóbulo (carpelo) con cornículo. Semillas globosas, marrón oscuro.



A



B

C

**Figura 05.-** A) Exsicata de *Plukenetia loretensis* depositada en el Herbarium Amazonense de la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana; B) Hojas y fruto de *P. loretensis*; C) Glándulas basilaminares en *P. loretensis*.

**Distribución.** Colombia: Amazonas; Venezuela: Amazonas, Bolívar; Guyana; Perú: Loreto, San Martín; Bolivia: Beni, y Brasil: Amazonas, Mato Grosso, Rondônia (Fig. 06).



**Figura 06.-**Distribución de *Plukenetia loretensis*.

### **3.- *Plukenetia brachybotrya* Muell. Arg., 1865**

*Plukenetia brachybotrya* Muell. Arg. Linnea 34:158. 1865.

Sinonimia:

*Apodandra brachybotrya* (Muell Arg.), J.F. MacBr., Field Mus. Nat. Hist.Bot.

Ser. 13(3a): 117. 1951. Tipo: Perú, Herb. Pavón ( holotipo: G-BOIS!; isotipos:

G! G-DC!)

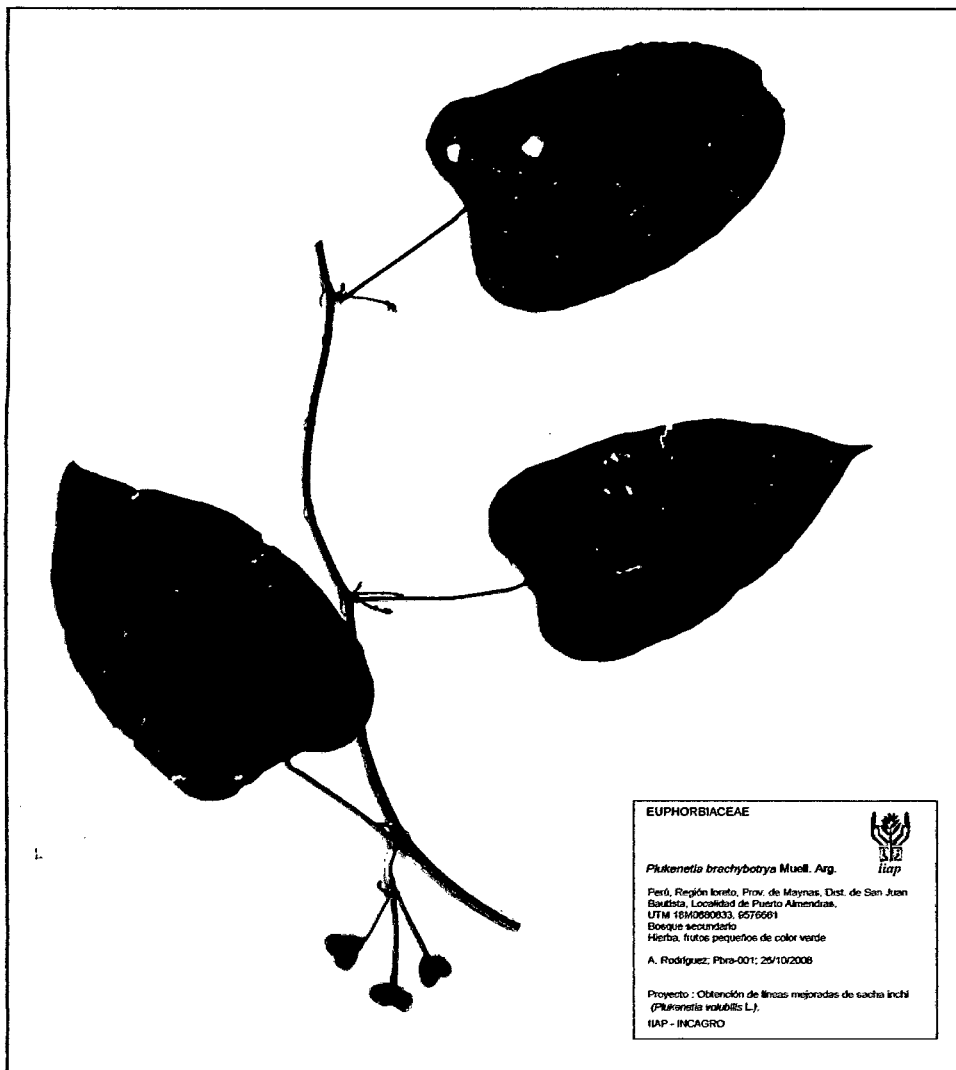
*Plukenetia buchtienii* Pax, Feddes Repert. 7:110. 1909.

*Apodandra buchtienae* (Pax) Pax & K. Hoffm., Pflanzenr. IV. 147. IX(Heft 68):

21. 1919. Tipo: Bolivia, Charopampa near Mapiri, Buchtien 1962 (holotipo:

presumiblemente B, destruido; lectotipo, aquí designado: US!; isolectotipo: NY!).

**Descripción.** Hoja pennatinervia, aguda, base caudada, borde liso. Frutas 1-2 cm de diámetro, capsular. Cápsula con tubérculo redondeado en cada carpelo; glándulas basilaminares. Diámetro de la cápsula aproximado 1.15 cm. Semilla redondeada, lisa (Fig. 07).



**Figura 07.-** A) Exsicata de *Plukenetia brachybotrya* depositada en el Herbarium Amazonense de la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana; B) Hojas y fruto de *P. brachybotrya*; C) Glándulas basilaminares en *P. brachybotrya*.

**Distribución.** Se encuentra en la región oeste de la Amazonía brasilera: Acre, posiblemente Amazonas, Mato Grosso y Pará; Ecuador; Perú y Bolivia (Fig. 08).



**Figura 08.**-Distribución de *Plukenetia brachybotrya*.

#### **4.-*Plukenetia volubilis* L., 1753**

*Plukenetia volubilis* L., Sp. pl., 1192, 1753. [Tipo: West Indies. Ilustración t. 13 (mitad inferior) en Plumier, Nov. pl. amer., 47, 1703].

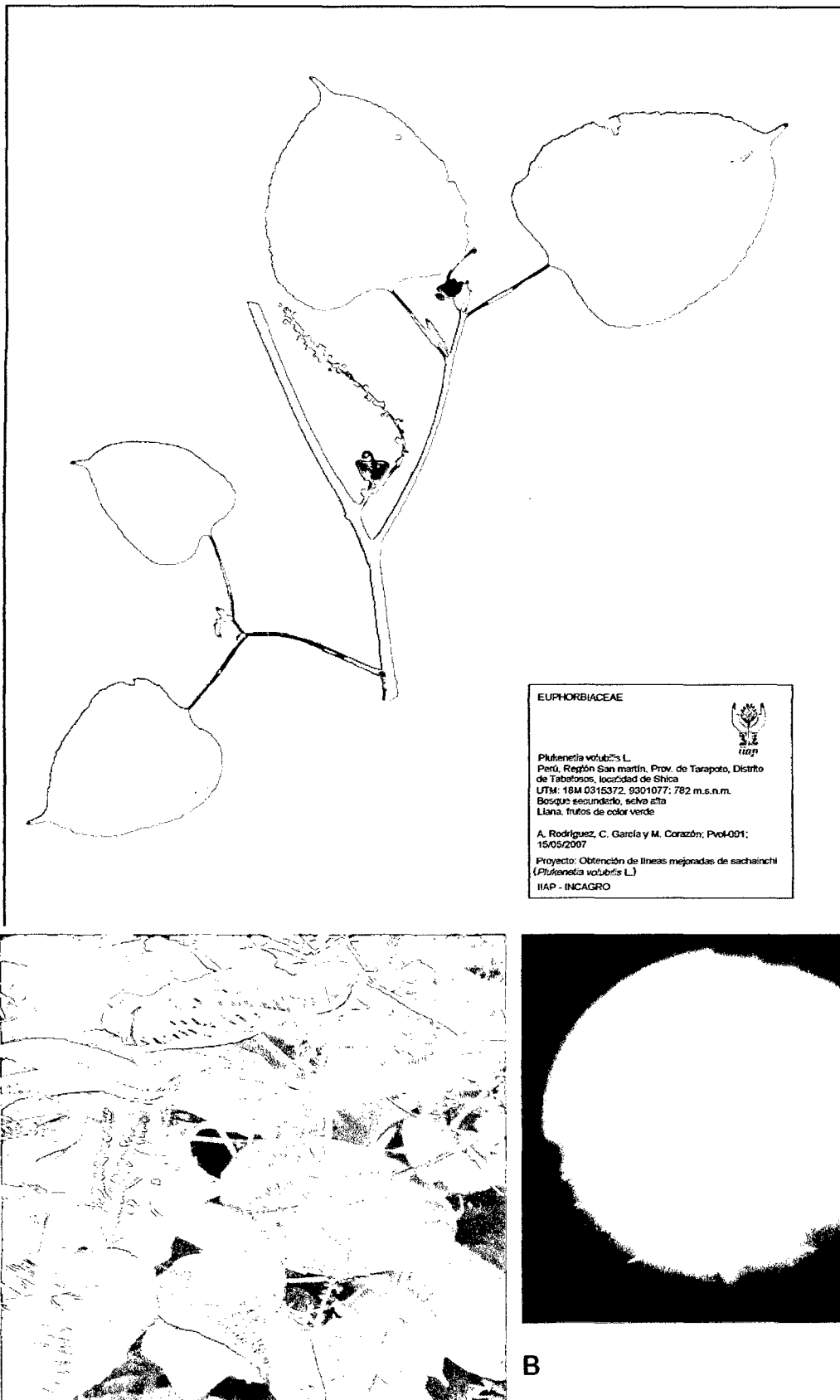
Sinonimia:

*Plukenetia peruviana* Muell. Arg., Linnaea, 34: 157, 1865. [Syntypes: Perú, *Herb. Pavón* (G-DC!, G!); Perú, Prov. Maynas, *Poeppig* 2110 (no visto)].

*Plukenetia macrostyla* Ule, Verh. Bot. Vereins Prov. Brandenburg, 80, 1908. [Tipo: Brasil, Amazonas, Río Juruá, bei Jabuni, Ule 5864 (isotipo, G! en el fragmento F)].

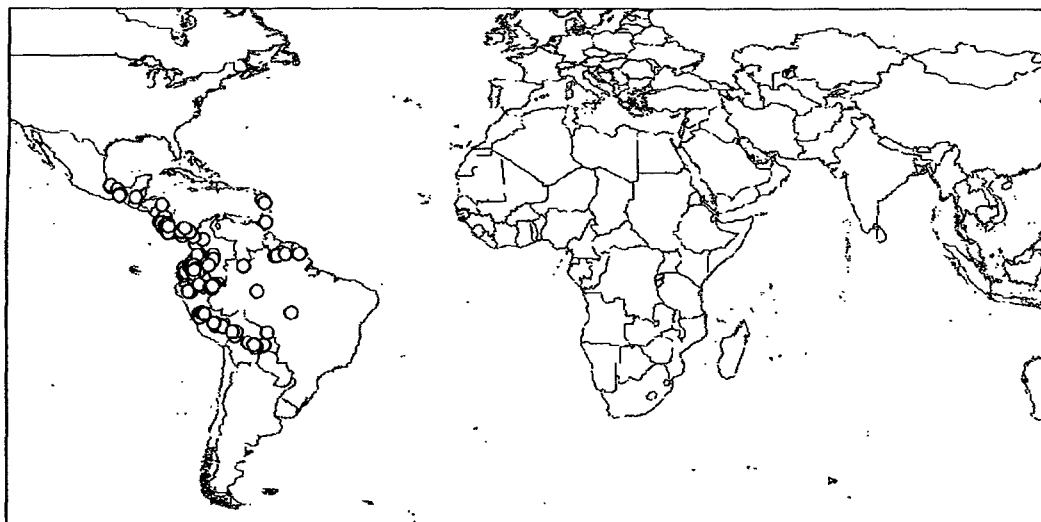


**Descripción.** Liana delgada (Fig. 09), monoica. Tallo glabrescente. Pecíolo 2.5-5 cm de longitud, glabro a pubescente; hoja membranosa, triangular-ovada, ápice largo-acuminado, borde crenado y base caudada; par de glándulas basilaminares. Inflorescencia axilar o terminal en pequeño vástago, racemosa. Cápsula generalmente 4-lobada, glabro, inicialmente carnosa, siendo leñoso y dehiscente, cada carpelo con ala central de 2 mm de ancho. Semillas aplanadas, lisas, oblonga en el contorno, marrón a marrón oscuro. Esta descripción corresponde a *Plukenetia volubilis* ecotipo San Martín.



**Figura 09.-** A) Exsicata de *Plukenetia volubilis* ecotipo San Martín depositada en el Herbarium Amazonense de la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana; B) Hojas, inflorescencia y fruto de *P.volubilis* ecotipo San Martín; C) Glándulas basilaminares en *P. volubilis* ecotipo San Martín.

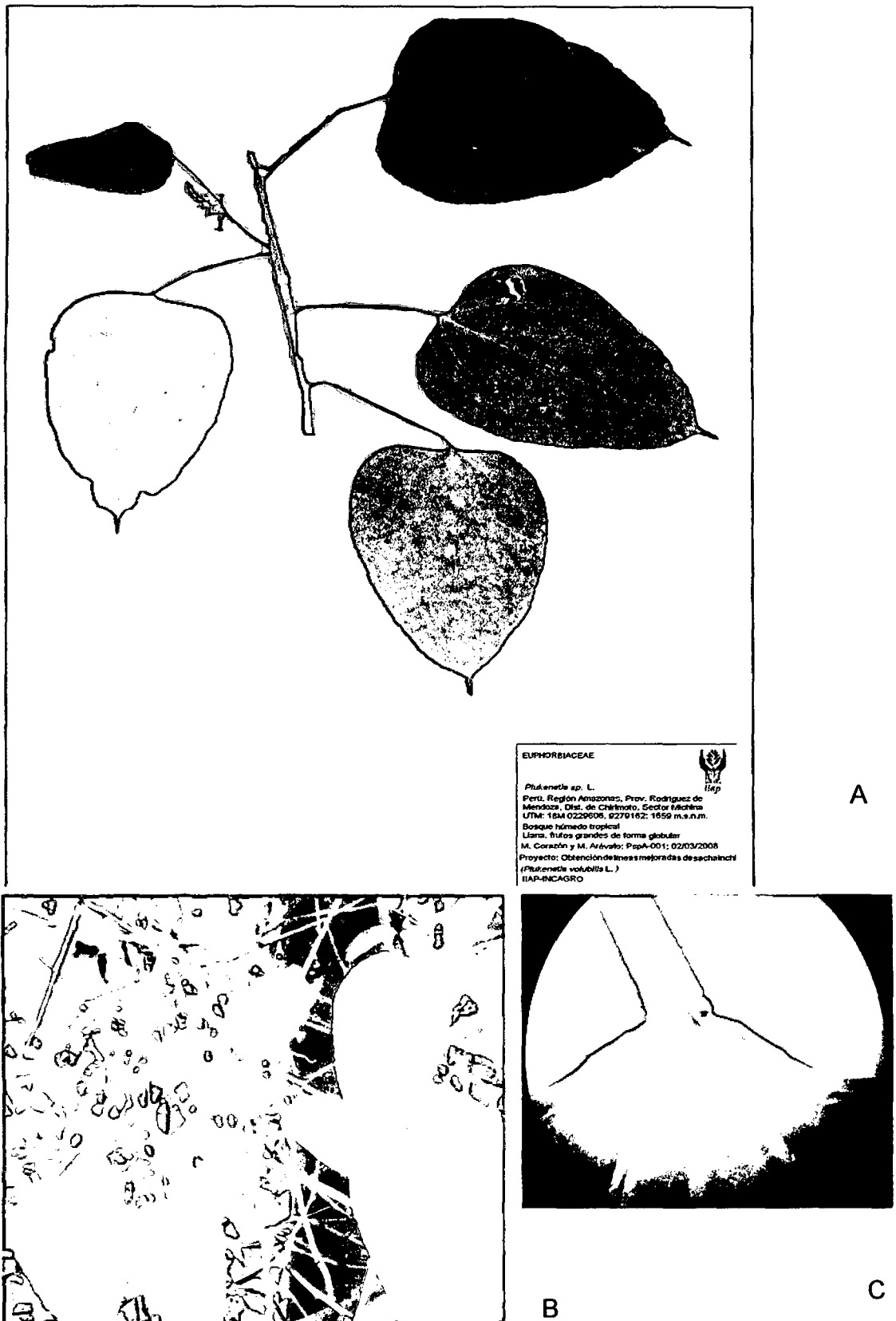
**Distribución.** Ampliamente distribuido en las Antillas Menores y América del Sur, donde se encuentra principalmente en las regiones del norte y oeste y los márgenes de la cuenca amazónica en Surinam, Venezuela (Amazonas), Colombia (Meta), Ecuador, Perú, Bolivia (Fig. 10).



**Figura 10.**-Distribución de *Plukenetia volubilis*.

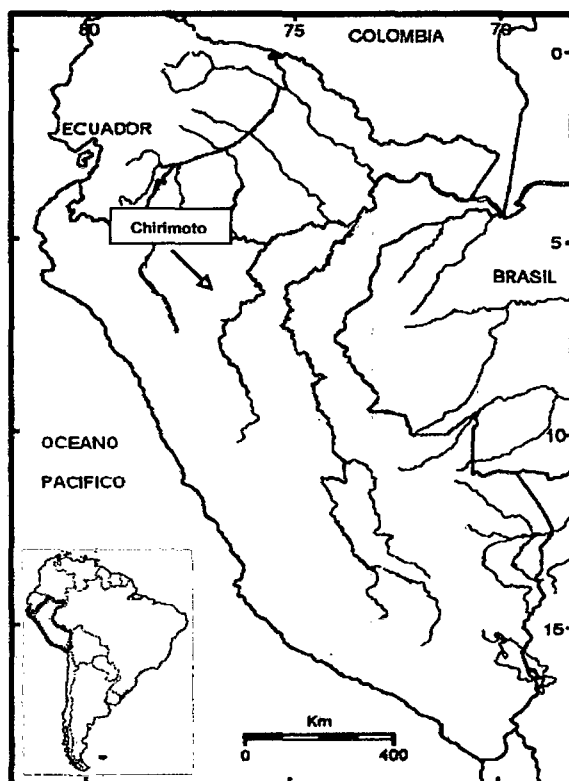
***Plukenetia volubilis* L., ecotipo Amazonas**

**Descripción.** Liana delgada. Tallo glabrescente. Pecíolo, glabro a pubescente; hoja membranosa, triangular-ovada, ápice largo-acuminado, borde crenado y base caudada; par de glándulas basilaminares relativamente distantes del pecíolo. Inflorescencia racemosa. Cápsula 4-lobada, glabro, carnosa, posteriormente leñosa y dehiscente, con ángulos guillados; diámetro aproximado 6 a 8 cm. Semillas rugosas y ligeramente aplanadas, marrón opaco a marrón oscuro. Base del tallo hexagonal en individuos jóvenes (Fig. 11).



**Figura 11.-** A) Exsicata de *Plukenetia volubilis* ecotipo Amazonas depositada en el Herbarium Amazonense de la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana; B) Hojas y fruto de *P. volubilis* ecotipo Amazonas; C) Glándulas basilaminares en *P. volubilis* ecotipo Amazonas.

**Distribución.** Selva alta, Región Amazonas, Provincia de Rodríguez de Mendoza, Distrito de Chirimoto, a 1659 m.s.n.m (Fig. 12).



**Figura 12.-**Distribución de *Plukenetia volubilis* ecotipo Amazonas en el Perú.

### ***Plukenetia volubilis* L., ecotipo Cusco**

**Descripción.** Liana delgada (Fig. 13), monoica. Tallo glabro. Pecíolo glabro a pubescente; hoja membranosa, triangular-ovada, ápice largo-acuminado, borde aserrado y base caudada; par de glándulas basilaminares relativamente distantes del pecíolo. Cápsula generalmente 4-lobada, glabro, inicialmente carnosa, siendo leñoso y dehiscente. Semillas ligeramente aplanadas y rugosas, marrón a marrón oscuro.

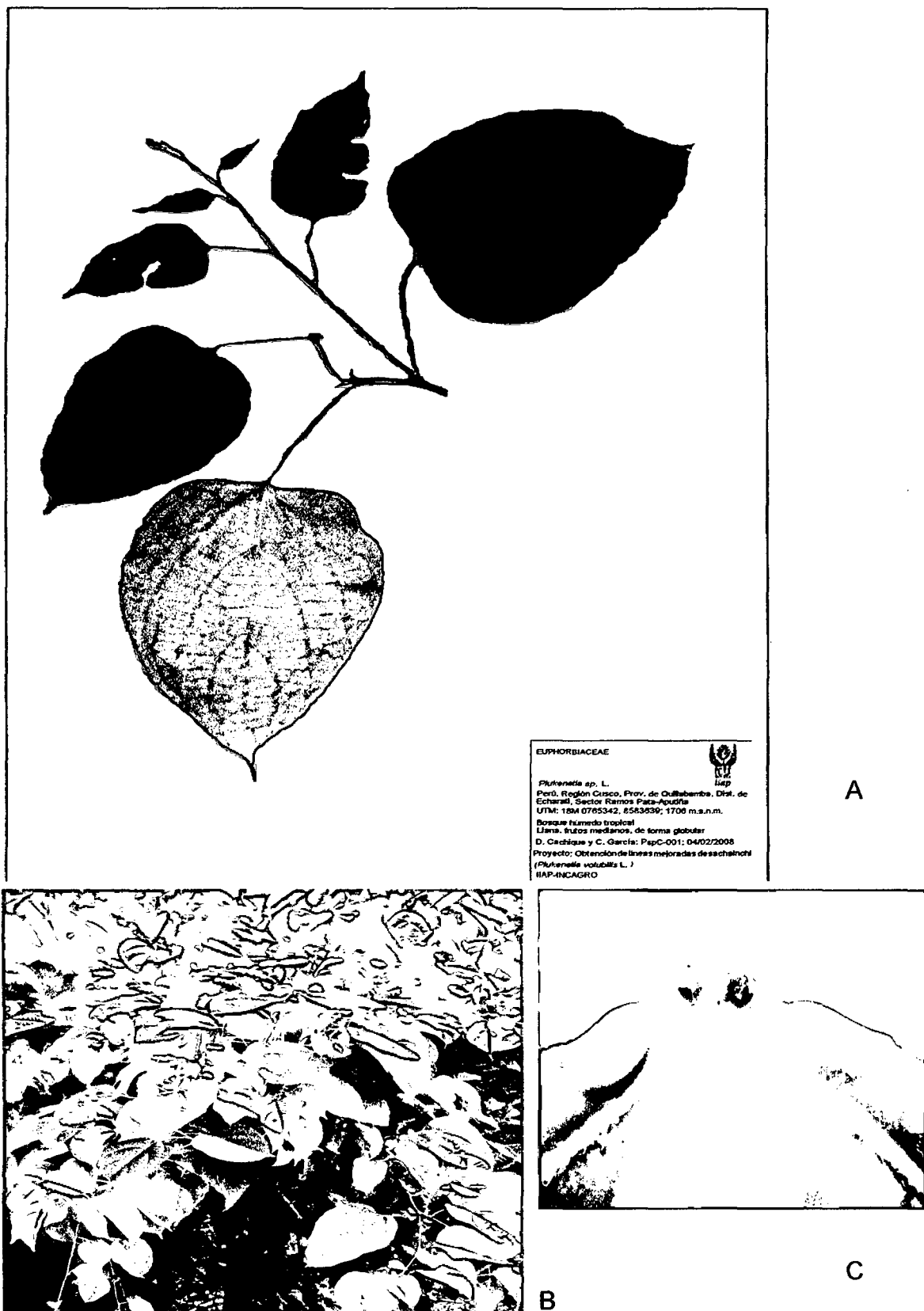
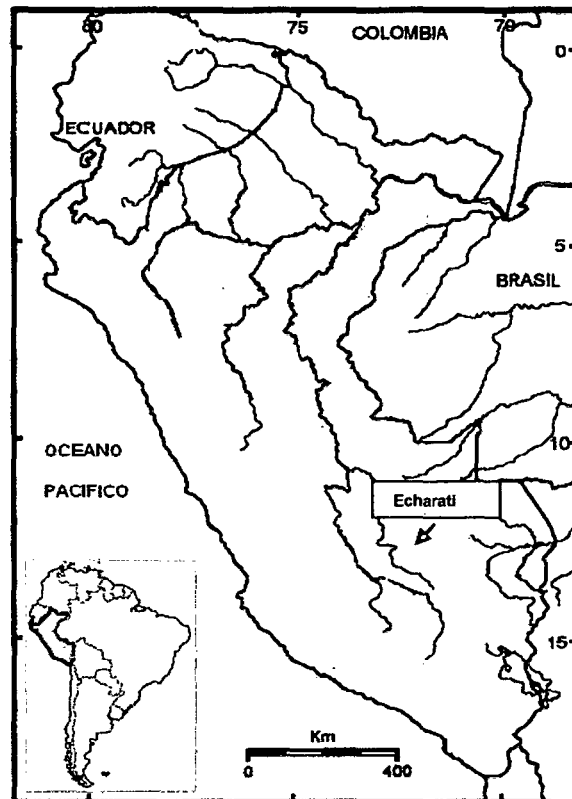


Figura 13.- A) Exsicata de *Plukenetia volubilis* ecotipo Cusco depositada en el Herbarium Amazonense de la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana; B) Hojas y fruto de *P. volubilis* ecotipo Cusco C) Glándulas basilaminares en *P. volubilis* ecotipo Cusco.

**Distribución.** Selva alta, Región Cusco, Provincia de La Convención, Distrito de Echarati, a 1706 m.s.n.m.



**Figura 14.-**Distribución de *Plukenetia volubilis* ecotipo Cusco en el Perú.

#### **4.1.2. Caracteres diagnósticos de los diferentes grupos de *Plukenetia***

A partir del material biológico colectado se han realizado observaciones sobre algunas diferencias morfológicas encontradas en los diferentes grupos de *Plukenetia*, identificándose caracteres diagnósticos de las cuatro especies reportadas para la Amazonía peruana, y asimismo estas observaciones han permitido diferenciar los tres ecotipos de *Plukenetia volubilis* de las especies conocidas y entre ellos mismos. Los principales caracteres morfológicos diferenciales observados entre los seis grupos estudiados del género *Plukenetia* se presentan a nivel de fruto, semilla, hoja y tallo (Tabla 03).

**Tabla 03:** Principales caracteres diagnósticos de las especies peruanas del género *Plukenetia*.

Caracteres observados	Grupos estudiados					
	<i>P. lorentensis</i>	<i>P. brachybotrya</i>	<i>P. polyadenia</i>	<i>P. volubilis</i> Ecotipo San Martín	<i>P. volubilis</i> Ecotipo Cusco	<i>P. volubilis</i> Ecotipo Amazonas
Glándulas foliares basilaminares	Glándulas basilaminares en uno o más pares próximas al pecíolo	Glándulas basilaminares numerosas próximas al pecíolo.	Un único promontorio glandular	Par de glándulas basilaminares próximas al pecíolo.	Par de glándulas basilaminares relativamente distantes del pecíolo.	Par de glándulas basilaminares relativamente distantes del pecíolo.
Borde y base de la hoja	Borde crenado y base caudada.	Borde liso y base caudada.	Borde liso y base acuminada.	Borde crenado y base caudada.	Borde aserrado y base caudada.	Borde crenado y base caudada.
Base del tallo	Redondeado	Redondeado	Aplanado	Redondeado	Redondeado	Hexagonal
Fruto (cápsula)	Cada carpelo con cornículo agudo	Cada carpelo con un tubérculo redondeado	Cuadrangular con ángulos quillados	Cuadrangular con ángulos quillados	Cuadrangular con ángulos quillados	Cuadrangular con ángulos quillados
Tamaño de la cápsula	Diámetro aproximado 1.15 cm.	Diámetro aproximado 1.15 cm.	Diámetro aproximado de 6-11 cm.	Diámetro aproximado de 5 a 6 cm.	Diámetro aproximado 5 a 6 cm.	Diámetro aproximado 6 a 8 cm.
Superficie de la semilla	Lisa	Lisa	Lisa	Lisa	Rugosa	Rugosa
Forma de la semilla	Redondeada	Redondeada	Redondeada	Aplanada	Ligeramente aplanada	Ligeramente aplanada
Tamaño semilla	Media = 0.51 x 0.42 cm	Media = 0.41 x 0.39 cm	Media = 2.89 x 2.6 cm	Media = 2.01 x 0.85 cm	Media = 2.01 x 1.36 cm	Media = 2.38 x 1.66 cm



Una de las características morfológicas diferenciales mas saltantes la encontramos en la forma y tamaño de las semillas de las diferentes especies y ecotipos de sacha inchi de la Amazonía peruana (Fig. 11). En las observaciones realizadas se han encontrado diferentes formas en la semillas que van desde redondeadas hasta ligeramente aplanadas; además existen diferencias en la superficie de las semillas, presentando superficie lisa en cuatro de los seis grupos (*P. lorentensis*, *P. brachybotrya*, *P. volubilis* y *P. polyadenia*), y rugosa en los ecotipos Cusco y Amazonas de *Plukenetia volubilis*. Asimismo se observo una considerable variación en el tamaño de las semillas, siendo bastante pequeñas en *P. brachybotrya* y *P. lorentensis*, intermedias en los tres ecotipos de *P. volubilis* y grandes en *P. polyadenia*. Entre los tres ecotipos de *P. volubilis* también se observo estas variaciones, siendo que las semillas mas pequeñas fueron encontradas en el ecotipo San Martín y las mas grandes en el ecotipo Amazonas.



**Figura 15.-** Semillas de las especies y ecotipos amazónicos del género *Plukenetia* estudiados; **A** = *P. brachybotrya*; **B** = *P. lorentensis*; **C** = *P. volubilis* ecotipo San Martín; **D** = *P. volubilis* ecotipo Cusco; **E** = *P. volubilis* ecotipo Amazonas; **F** = *P. polyadenia*.

## 4.2. Caracterización molecular

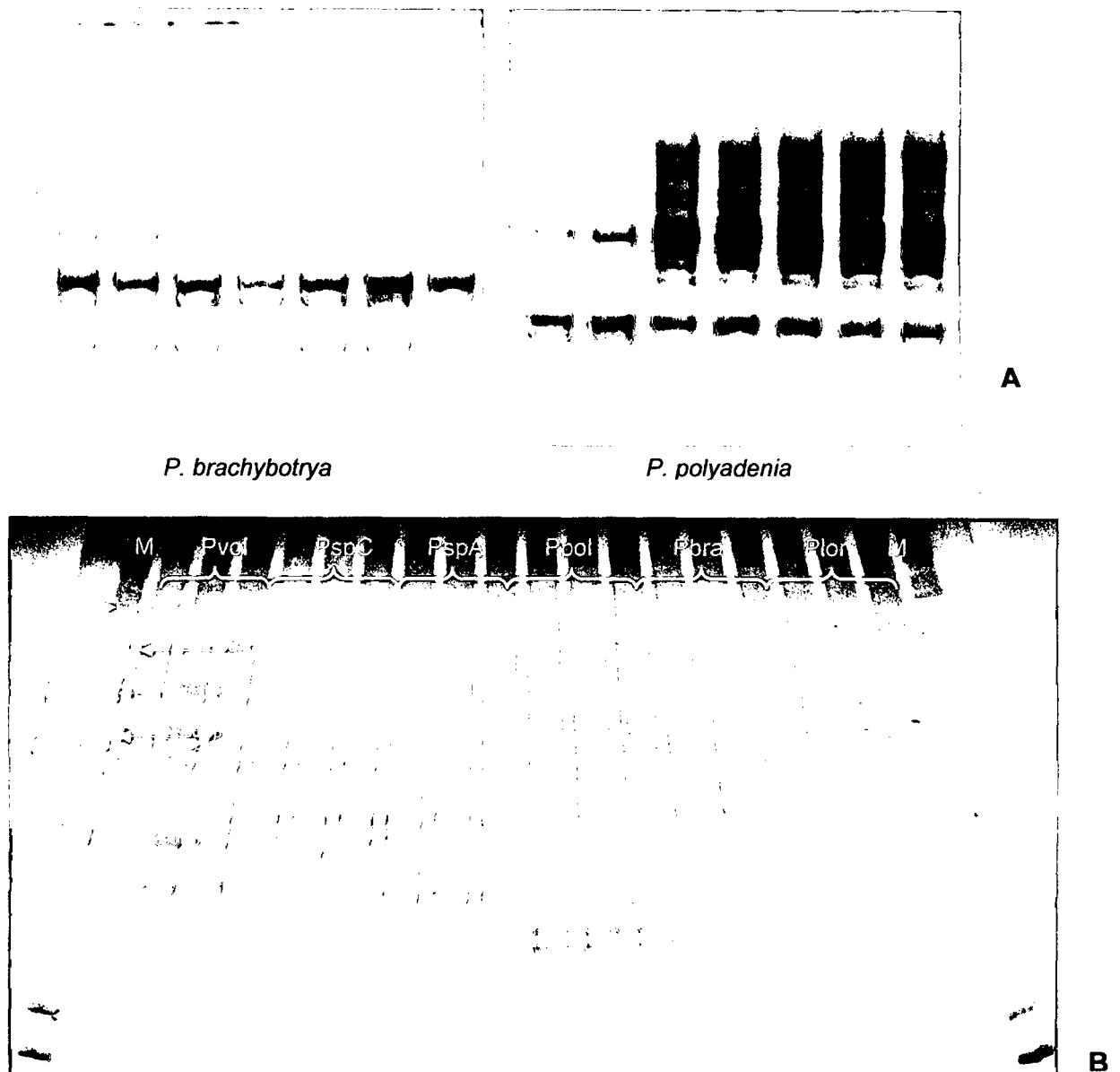
### 4.2.1. Polimorfismo de ISSR

De los cuatro primers ISSR testados (CAA, CAG, GACA y GATA) en la amplificación de ADN de Sacha inchi tres fueron informativos (CAA, CAG y GACA), mostrando polimorfismo (diferenciación) entre los diferentes grupos estudiados. Los tres marcadores generaron un total de 59 bandas informativas entre los diferentes grupos, de las cuales 29 fueron bandas diagnósticas, es decir están presentes exclusivamente en uno solo de los seis grupos en estudio (Tabla 04).

**Tabla 04:** Diversidad genética del género *Plukenetia* por marcador ISSR usado

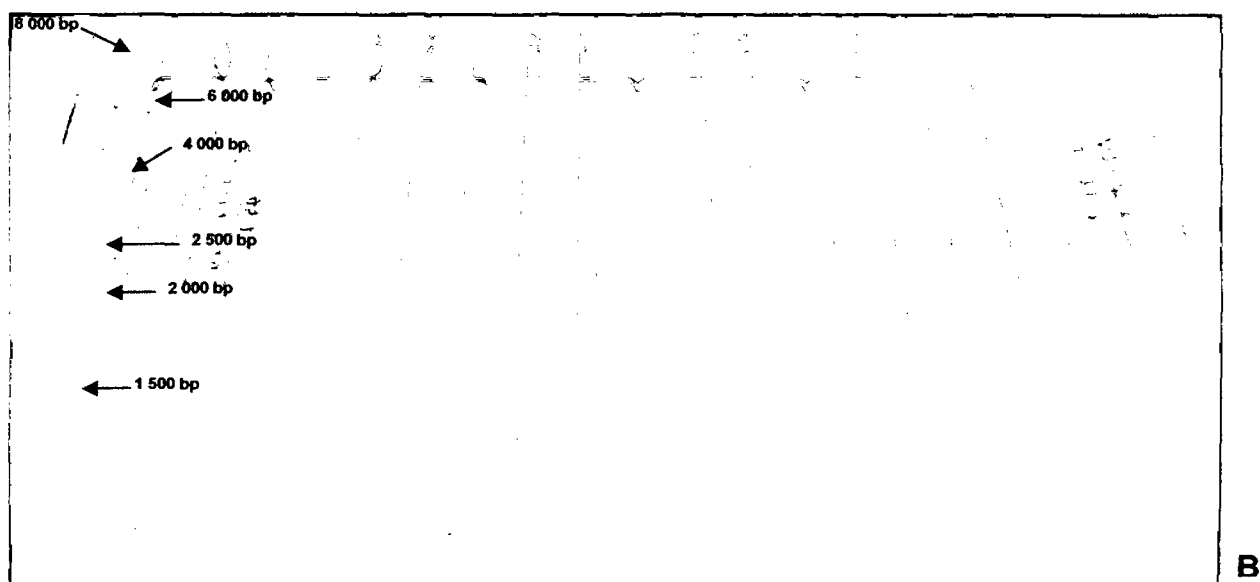
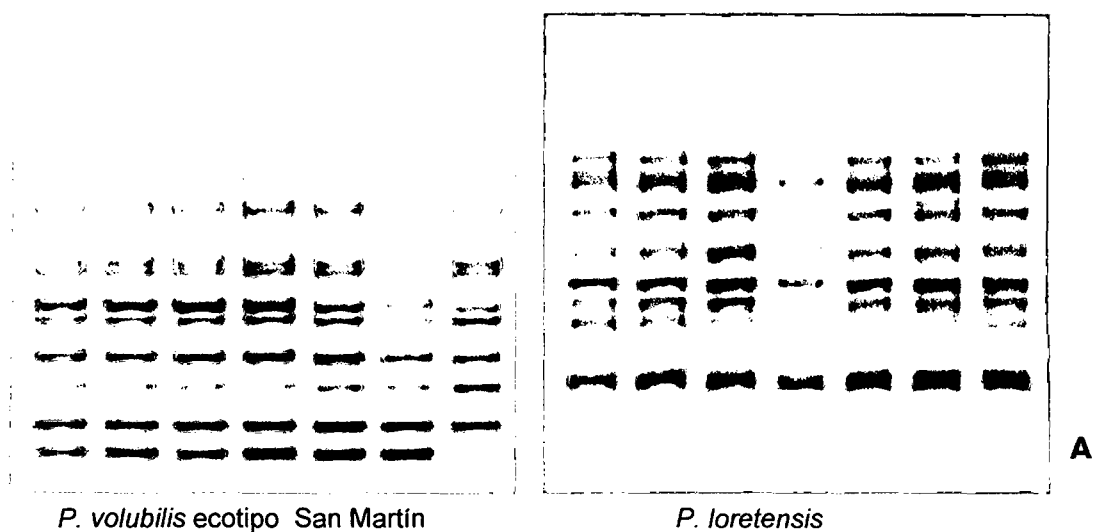
Marcadores	Bandas polimórficas	Bandas diagnósticas
CAA	10	3
CAG	16	8
GACA	33	18
Total	59	29

El marcador menos informativo entre los tres analizados fue CAA, aportando en total diez bandas polimórficas (diferenciales) para la construcción de los genotipos totales; de las cuales tres bandas fueron diagnósticas: una para *Plukenetia polyadenia*, otra para *Plukenetia brachybotrya* y la tercera para *Plukenetia lorentensis* (Fig. 16 A y B).



**Figura 16.-** A: Geles de agarosa al 2% mostrando productos de amplificación con primer CAA; B: Gel de poliacrilamida al 6% mostrando los productos de amplificación de los seis grupos de *Plukenetia* con el primer CAA: Pvol = *Plukenetia volubilis* ecotipo San Martín, PspC = *Plukenetiavolubilis* ecotipo Cusco, PspA = *Plukenetiavolubilis* ecotipo Amazonas, Ppol = *Plukenetia polyadenia*, Pbra = *Plukenetia brachybotrya*, Plor = *Plukenetia lorentensis*

CAG fue medianamente informativo entre los grupos, aportando 16 bandas polimórficas, de las cuales ocho fueron diagnósticas: cuatro para *Plukenetia brachybotrya*, tres para *Plukenetia polyadenia* y una para *Plukenetia volubilis* ecotipo Amazonas (Fig. 17 A y B).



**Figura 17.-** A: Geles de agarosa al 2% mostrando productos de amplificación con primer CAG; B: Gel de poliacrilamida al 6% mostrando los productos de amplificación de los seis grupos de *Plukenetia* con el primer CAG: Pvol = *Plukenetia volubilis* ecotipo San Martín, PspC = *Plukenetiavolubilis* ecotipo Cusco, PspA = *Plukenetiavolubilis* ecotipo Amazonas, Ppol = *Plukenetia polyadenia*, Pbra= *Plukenetia brachybotrya*, Plor = *Plukenetia lorentensis*.

El marcador GACA presentó el mayor polimorfismo contribuyendo con 33 bandas informativas a los genotipos totales y generando 18 bandas diagnosticas: cinco para *Plukenetia polyadenia*, cuatro para *Plukenetia lorentensis*, tres para *Plukenetia volubilis* ecotipo Cusco, tres para *Plukenetia*

*volubilis* ecotipo San Martín, dos para *Plukenetia brachybotrya* y por último una para *Plukenetia volubilis* ecotipo Amazonas (Fig. 18 A y B).

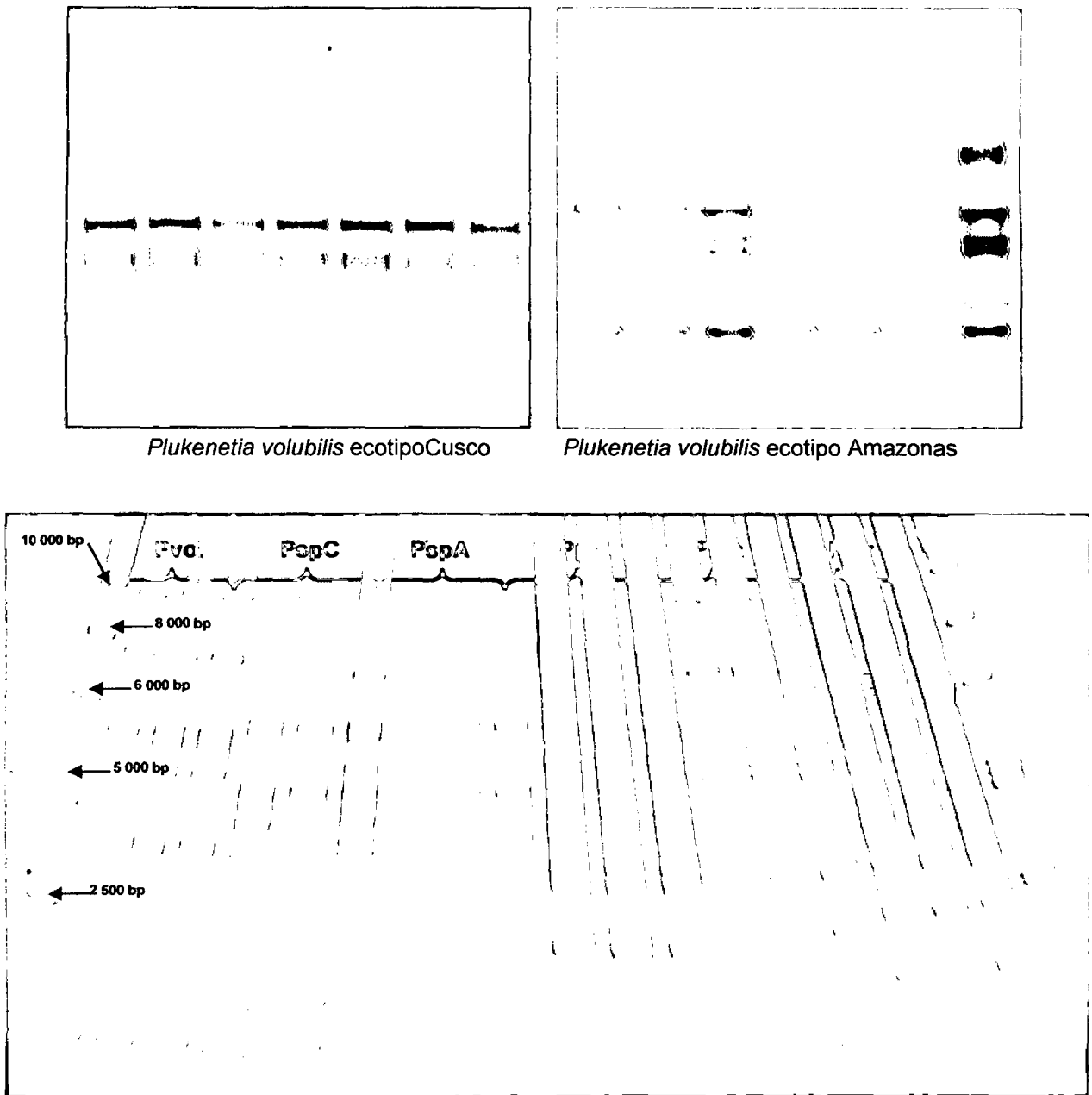


Figura 18.- **A:** Geles de agarosa al 2% mostrando productos de amplificación con primer GACA; **B:** Gel de poliacrilamida al 6% mostrando los productos de amplificación de los seis grupos de *Plukenetia* con el primer GACA: Pvol = *Plukenetia volubilis* ecotipo San Martín, PspC = *Plukenetiavolubilis* ecotipo Cusco, PspA = *Plukenetiavolubilis* ecotipo Amazonas, Ppol = *Plukenetia polyadenia*, Pbra= *Plukenetia brachybotrya*, Plor = *Plukenetia lorentensis*

#### 4.2.2. Genotipos totales

En la Tabla 05 se muestran los genotipos totales obtenidos para cada grupo estudiado, los cuales fueron obtenidos mediante la suma de los genotipos de los tres primers analizados (CAA, CAG y GACA).

**Tabla 05.- Genotipos totales encontrados en los seis grupos del género *Plukenetia* analizados con tres marcadores ISSR.**

Especie y ecotipos	Nombre de genotipo	Número de individuos por genotipo	Genotipo
<i>Plukenetia volubilis</i> ecotipo San Martín	V-A	9	AABBBBABBABBABBBBABBABBABAAABBBBABBABBABBABBBBABBABBBB
	V-B	3	AABBBBABBABBABBBBABBABBABAAABBBBABBABBABBABBBBABBABBBB
	V-C	1	ABBBBABBABBABBBBABBABBABAAABBBBABBABBABBABBBBABBABBBB
	V-D	2	AAABBBABBABBABBBBABBABBABAAABBBBABBABBABBABBBBABBABBBB
	V-E	6	ABABBBABBABBABBBBABBABBABAAABBBBABBABBABBABBBBABBABBBB
<i>Plukenetia volubilis</i> ecotipo Cusco	C-A	16	ABBBBABBABBABBBBABBABBABAAABBBBABBABBABBABBBBABBABBBB
	C-B	1	ABBBBABBABBABBBBABBABBABAAABBBBABBABBABBABBBBABBABBBB
	C-C	1	ABBBBABBABBABBBBABBABBABAAABBBBABBABBABBABBBBABBABBBB
	C-D	1	ABABBBABBABBABBBBABBABBABAAABBBBABBABBABBABBBBABBABBBB
	C-E	2	ABABBBABBABBABBBBABBABBABAAABBBBABBABBABBABBBBABBABBBB
<i>Plukenetia volubilis</i> ecotipo Amazonas	A-A	17	ABBBBABBABBABBBBABBABBABAAABBBBABBABBABBABBBBABBABBBB
	A-B	1	BBBBBBABBABBABBBBABBABBABAAABBBBABBABBABBABBBBABBABBBB
	A-C	2	ABBBBABBABBABBBBABBABBABAAABBBBABBABBABBABBBBABBABBBB
	A-D	1	BBBBBBABBABBABBBBABBABBABAAABBBBABBABBABBABBBBABBABBBB
<i>Plukenetia polyadenia</i>	P-A	8	BBBABBABBABBABBABBABABBBBABBABBABBABBABBABBABBABBABBABB
	P-B	4	BBBABBABBABBABBABBABABBBBABBABBABBABBABBABBABBABBABBABB
	P-C	1	BBBABBABBABBABBABBABABBBBABBABBABBABBABBABBABBABBABBABB
	P-D	1	BABABBABBABBABBABBABABBBBABBABBABBABBABBABBABBABBABBABB
	P-E	6	BBBABBABBABBABBABBABABBBBABBABBABBABBABBABBABBABBABBABB
	P-F	1	BBBABBABBABBABBABBABABBBBABBABBABBABBABBABBABBABBABBABB

Continuación de tabla 05 (Pág. Anterior)

Especie	Nombre de genotipo	Número de individuos por genotipo	Genotipo
<i>Plukenetia brachybotrya</i>	B-A	15	AABBABABABBABABBAAAABBBABABBBBBAABBBBABBABBBBABBABBBBABA
	B-B	3	AABBABABABBABABBAAAABBBABABBBBBAABBBBABBABBBBABBABBBBABA
	B-C	3	ABBBABABABBABABBAAAABBBABABBBBBAABBBBABBABBBBABBABBBBABA
<i>Plukenetia lorentensis</i>	L-A	11	ABABBABABABBBABBABAABBBABBBBBAABBBABABBABBABBABBABBBBABB
	L-B	1	ABABBABBBABBBABBABAABBBABBBBBAABBBABBBBABBABBABBABBABBBBABB
	L-C	2	ABABBABABABBBABBABAABBBABBBBBAABBBABBBBABBABBABBABBABBBBABB
	L-D	2	AAABBABABABBBABBABAABBBABBBBBAABBBABBBBABBABBABBABBABBBBABB
	L-E	2	ABABBABABABBBABBABAABBBABBBBBAABBBABBBBABBABBABBABBABBBBABB
	L-F	1	ABABBABABABBBABBABAABBBABBBBBAABBBABBBBABBABBABBABBABBBBABB
	L-G	2	ABABBABBBABBBABBABAABBBABBBBBAABBBABBBBABBABBABBABBABBBBABB

#### 4.2.3. Análisis Factorial de Correspondencia (AFC)

El resultado del análisis factorial de correspondencia muestra que los seis grupos estudiados están claramente diferenciados a nivel genético sin sobreposición alguna entre ellos (Fig. 15), los porcentajes de inercia explicado por los ejes 1, 3 y 4 son 37.88%, 17.14% y 9.71% respectivamente. Las mayores contribuciones a la inercia mostradas por diferentes individuos de los grupos en estudio fueron: 16 en el FC1, 27 en el FC3 y 34 en el FC4, (Tabla 06).

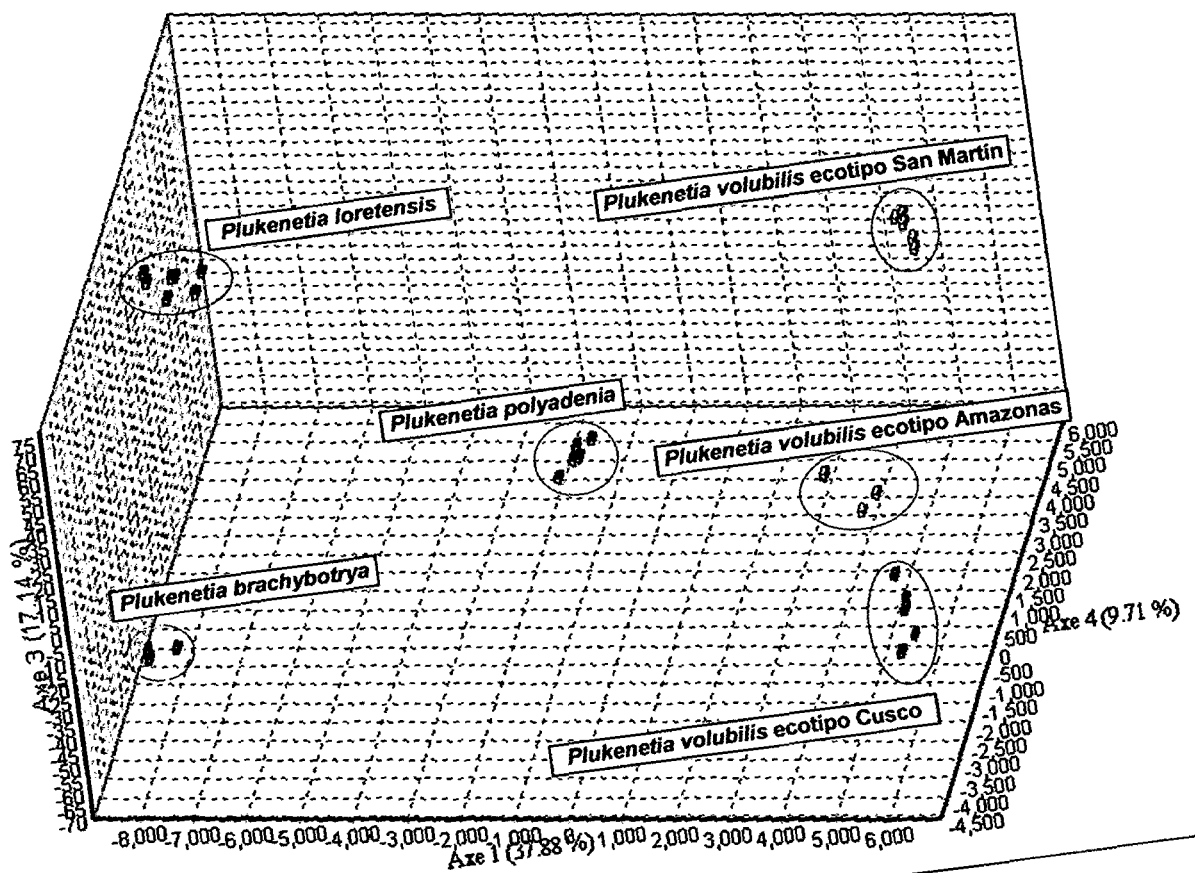


Figura 19.- Proyección gráfica de los resultados del AFC con los ejes 1, 3 y 4 para los individuos de los seis grupos en estudio de *Plukenetia*.



**Tabla 06.- Individuos de *Plukenetia* que contribuyeron mas a la inercia (separación) en los tres factores de correspondencia.**

Individuo	Contribución absoluta FC1	Individuo	Contribución Absoluta FC3	Individuo	Contribución absoluta FC4
Pbra01	16	Plor6	27	Pvol14	34
Pbra02	16	Plor10	27	Pvol15	34
Pbra03	16	Plor13	27	Pvol7	33
Pbra10	16	Plor14	27	Pvol8	33
Pbra11	16	Plor15	27	Pvol9	33
Pbra12	16	Plor1	26	Pvol1	32
Pbra13	16	Plor2	26	Pvol2	32
Pbra14	16	Plor4	26	Pvol3	32
Pbra15	16	Plor5	26	Pvol4	32
Pbra16	16	Plor9	26	Pvol5	32
Pbra17	16	Plor11	26	Pvol6	32
Pbra18	16	Plor12	26	Pvol10	32
Pbra19	16	Plor16	26	Pvol11	32
Pbra20	16	Plor17	26	Pvol12	32
Pbra21	16	Plor18	26	Pvol16	28
Pbra07	15	Plor21	26	Pvol17	28
Pbra08	15	Pbra4	23	Pvol18	28
Pbra09	15	Pbra5	23	Pvol19	28
Pbra04	14	Pbra6	23	Pvol20	28
Pbra05	14	Plor8	23	Pvol21	28
Pbra06	14				

Pbra: *Plukenetia brachybotrya*, Plor: *Plukenetia loretensis*, Pvol: *Plukenetia volubilis* ecotipo San Martín

#### 4.2.4. Índice de fijación $F_{st}$

El análisis de  $F_{ST}$  entre pares de grupos (Tabla 07) muestra un alto grado de diferenciación entre todos los grupos analizados (elevada significancia,  $p = 0$ ). Según este test *Plukenetia brachybotrya* y *Plukenetia volubilis* ecotipo Cusco son más distantes genéticamente (0.98491,  $p = 0$ ). Mientras que *Plukenetia volubilis* ecotipo Amazonas y *Plukenetia volubilis* ecotipo San Martín se mostraron como los grupos más cercanos (0.89562,  $p = 0$ ). Todos los resultados fueron estadísticamente significativos.

**Tabla 07.-** Estimación del  $F_{st}$  para los seis grupos de *Plukenetia*.

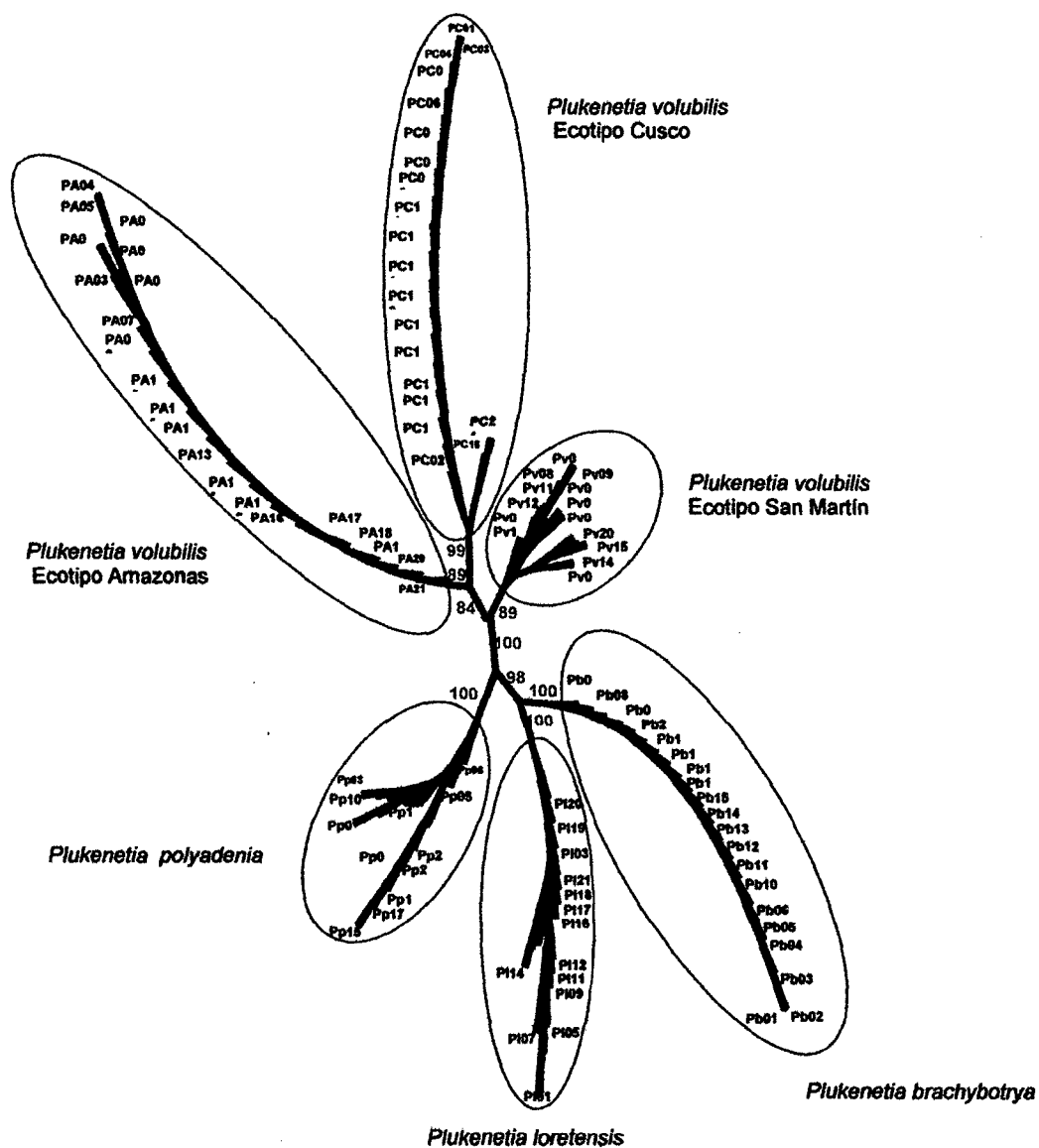
Especie	<i>Plukenetia volubilis</i> ecotipo <i>volubilis</i>	<i>Plukenetia volubilis</i> ecotipo Cusco	<i>Plukenetia volubilis</i> ecotipo Amazonas	<i>Plukenetia polyadenia</i>	<i>Plukenetia brachybotrya</i>	<i>Plukenetia loretensis</i>
<i>Plukenetia volubilis</i> ecotipo San Martín	-	<b>0.92804***</b>	<b>0.89562***</b>	<b>0.95347***</b>	<b>0.97088***</b>	<b>0.96092***</b>
<i>Plukenetia volubilis</i> ecotipo Cusco	100.00	-	<b>0.91025***</b>	<b>0.96939***</b>	<b>0.98491***</b>	<b>0.97678***</b>
<i>Plukenetia volubilis</i> ecotipo Amazonas	100.00	100.00	-	<b>0.95738***</b>	<b>0.97519***</b>	<b>0.96564***</b>
<i>Plukenetia polyadenia</i>	100.00	100.00	100.00	-	<b>0.97223***</b>	<b>0.96298***</b>
<i>Plukenetia brachybotrya</i>	100.00	100.00	100.00	100.00	-	<b>0.95991***</b>
<i>Plukenetia loretensis</i>	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	-

\*\*\* Altamente significativo,  $p = 0$ ; parte inferior izquierda de la tabla: porcentaje de valores de Theta inferiores a los datos reales

#### 4.2.5. Relaciones interespecíficas

El dendograma estimado según el método de Parsimonia de Wagner (Eck & Dayhoff, 1966; Kluge & Farris, 1969) y elaborado a partir de los perfiles

genéticos de los diferentes grupos del género *Plukenetia*, muestra una clara estructuración entre las especies y ecotipos con la formación de seis grupos genéticos diferentes (Fig. 16) confirmando las agrupaciones observadas en el análisis AFC.



10

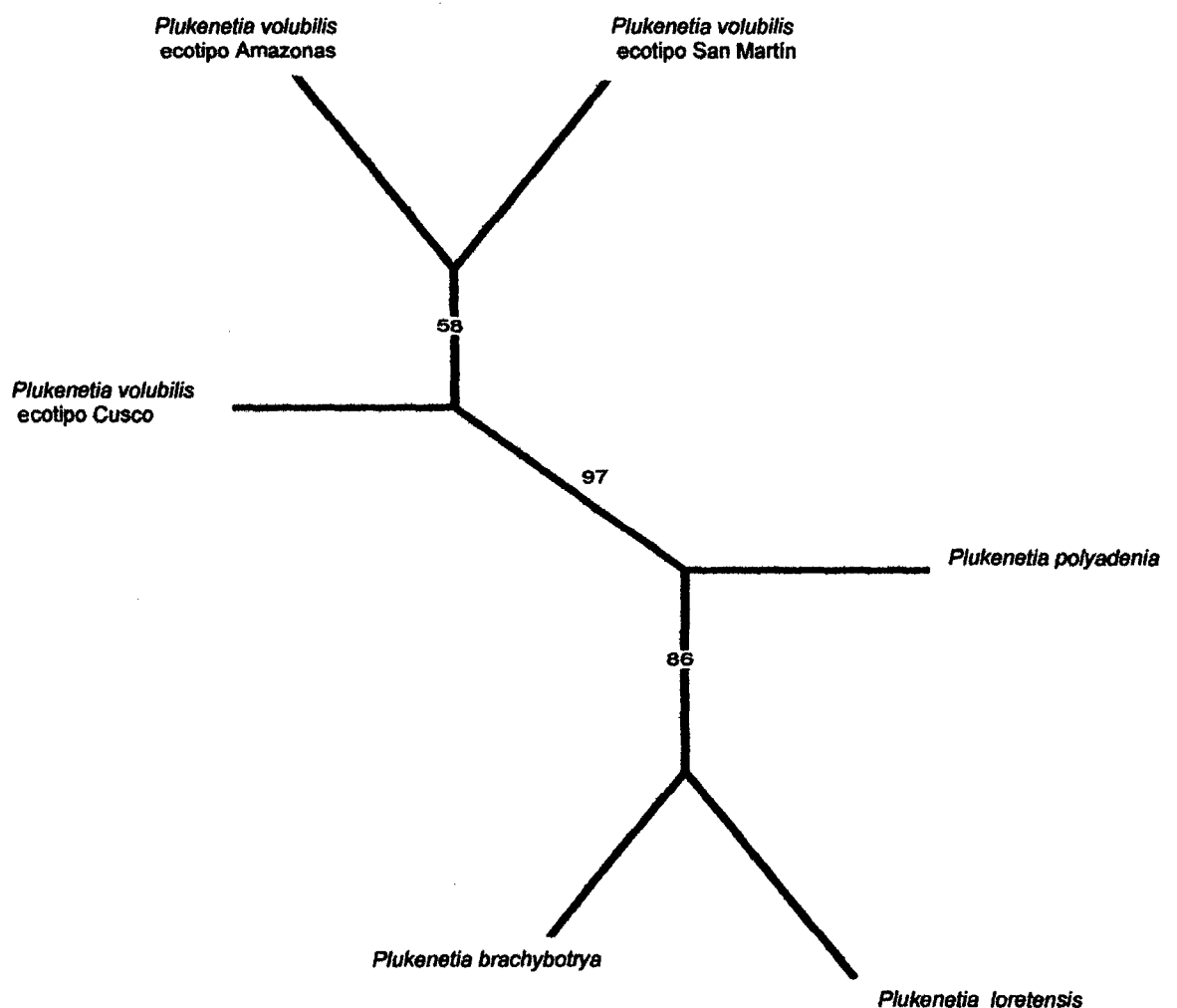
Figura 20.- Dendrograma elaborado a partir de los perfiles genéticos con el método de Wagner (Eck & Dayhoff, 1966; Kluge & Farris, 1969) de los seis grupos de *Plukenetia* estudiados.

Las distancias genéticas (Tabla 08) estimadas según Reynolds, Weir & Cockerham (1983) a partir de las frecuencias genéticas de los diferentes grupos, muestran diferencias marcadas entre cada par de grupos. Siendo que *Plukenetia volubilis* ecotipo Amazonas y *Plukenetia volubilis* ecotipo San Martín presentaron la menor distancia encontrada (2.25973). En cuanto que *Plukenetia brachybotrya* y *Plukenetia volubilis* ecotipo Cusco presentaron la mayor distancia genética (4.19378).

**Tabla 08.-** Distancias genéticas según Reynolds, Weir & Cockerham (1983) para los seis grupos de *Plukenetia*.

Especie	<i>P. volubilis</i> ecotipo San Martín	<i>P. volubilis</i> ecotipo Cusco	<i>P. volubilis</i> ecotipo Amazonas	<i>P.</i> <i>polyadenia</i>	<i>P.</i> <i>brachybotrya</i>	<i>P. lorentensis</i>
<i>P. volubilis</i> ecotipo San Martín	-	2.63171	2.25973	3.06761	3.53633	3.24215
<i>P. volubilis</i> ecotipo Cusco		-	2.41075	3.48649	4.19378	3.76277
<i>P. volubilis</i> ecotipo Amazonas			-	3.15540	3.69661	3.37093
<i>P.</i> <i>polyadenia</i>				-	3.58366	3.29635
<i>P.</i> <i>brachybotrya</i>					-	3.21657
<i>P. lorentensis</i>						-

El dendograma obtenido mediante el método UPGMA a partir de las distancias genéticas (Fig. 21) mostró una clara diferenciación entre los seis grupos en estudio con la formación de dos clados: el primero conformado por los tres ecotipos de *Plukenetia volubilis* dentro del cual se observa una sub-agrupación constituida por los ecotipos Amazonas y San Martín; el segundo clado lo conforman *Plukenetia polyadenia*, *P. lorentensis* y *P. brachybotrya*, siendo que *P. brachybotrya* y *P. lorentensis* son las más relacionadas genéticamente.



10

**Figura 21.** Dendograma de los seis grupo del genero *Plukenetia* elaborado mediante el método UPGMA a partir de los datos de distancia genética de Reynolds, Weir & Cockerham (1983).

## V. DISCUSION

*Plukenetia volubilis* es una especie de gran interés agrícola, que en años recientes ha sido reconocida por su alto contenido en ácidos grasos esenciales, lo que motivo una expansión acelerada de su cultivo en diversas regiones del país.

Como es sabido la explotación no planeada de una especie tiende por un lado a erosionarlo genéticamente al homogenizar los cultivos, desapareciendo entonces los cultivares locales y variedades nativas, muchas de ellas con características de resistencia a plagas y enfermedades (Mejía, 1998). Por otro lado en este proceso de expansión muchas veces desordenada y acelerada de un cultivo, se puede llegar a confundir especies emparentadas de un mismo género, tratándose las diferencias morfológicas (caracteres diagnósticos) como variabilidad o plasticidad de caracteres morfológicos dentro de la especie, denominándose a este material biológico como ecotipos o morfotipos, debido a la diferencia en el lugar de procedencia o a la diferencia en la forma del material respectivamente.

En el caso del sachá inchi la información registrada hasta el momento en la literatura científica y técnica esta principalmente direccionada a la recolección de información sobre diversos usos y modalidades del cultivo, así como la colección de germoplasma y evaluación de ecotipos de *Plukenetia volubilis* (Arévalo, 1995; Manco, 2006). No existiendo estudios moleculares que ayuden a delimitar los límites taxonómicos (establecidos en base a caracteres morfológicos por Gillespie, 1993) entre las especies amazónicas descritas hasta el momento para este género. Así como nos ayuden a esclarecer si las

variaciones morfológicas observadas en materiales biológicos procedente de algunas localidades representan plasticidad del carácter o en su defecto representan especies aun no descritas del genero *Plukenetia*.

### 5.1. Identificación botánica

La familia Euphorbiaceae esta constituida por especies de gran interés económico, tales como *Hevea brasiliensis*, *Manihot esculenta* o *Plukenetia volubilis*, esta familia se caracteriza porque sus especies presentan composiciones químicas y morfológicas de las más diversas e interesantes entre las familias de angiospermas (Seigler, 1994). La tribu Plukenetieae, es un grupo cosmopolita, extenso dividido en dos subtribus: Plukenetiinae y Tragiinae (Gillespie, 1994). En la revisión del género *Plukenetia* de Gillespie (1993) son propuestas 11 especies neotropicales en este género. Las cuales fueron divididas en dos grupos informales de especies, en base a la forma del estilo, morfología del androecio, estructura exina del polen, tamaño del fruto y forma de la hoja. El primer grupo *Cylindrophora* esta conformado por *Plukenetia volubilis*, *P. lehmaniana*, *P. polyadenia* y *P. stipellata*, se caracterizan por presentar estilos parcialmente unidos dentro de una columna estilar común, androecio en el cual los estambre tienen cada uno distintos filamentos, polen con tectum foveolado, fruto grande, hojas palmadamente nervada o trinervada, cordiforme, ovada o extensamente elípticas. El segundo grupo: *Euplukenetia*, se caracteriza por presentar estilos enteramente unidos, todas o la mayor parte de anteras sésiles, polen con tectum reticulado, pequeñas cápsulas secas y hojas elípticas y pennatinervias, este grupo lo conforman: *P. brachybotrya*, *P. lorentensis* y *P. verrucosa* (Gillespie, 1993). En el campo el género *Plukenetia*

puede ser identificado por la presencia de glándulas basilaminares en el lado adaxial de la lámina foliar, el fruto 4-lobado y el hábito frecuentemente trepador y algunas veces rastrero.

En este estudio la corroboración de la identidad taxonómica de los seis grupos de *Plukenetia* colectadas en la Amazonia peruana fue realizada en base a la revisión de las muestras botánicas de las diferentes especies de *Plukenetia* depositadas en el Herbarium Amazonense, a la clave de identificación propuesta por Gillespie (1993) y a observaciones morfológicas adicionales del material biológico *in situ* y *ex situ*. Un análisis primario de los resultados nos permitió separar los seis grupos de *Plukenetia* en estudio, en cuatro especies taxonómicas: *Plukenetia volubilis*, *P. polyadenia*, *P. lorentensis* y *P. Brachybotrya*. Las dos últimas especies fueron separadas de las demás con claridad como propuesto por Gillespie (1993), por la presencia un par a numerosas glándulas basilaminares cerca al pecíolo, en cuanto que en *P. polyadenia* se observó un único promontorio glandular; en el caso de *Plukenetia volubilis* se observa la presencia de solo un par de glándulas basilaminares situadas en la proximidad al ápice del pecíolo, en tanto que en el ecotipo Cusco y Amazonas dichas glándulas están relativamente distantes al ápice del pecíolo. Otras pequeñas diferencias observables entre los seis grupos lo encontramos en la forma de los bordes y base de las hojas; *P. lorentensis* presenta borde crenado al igual que *P. volubilis* ecotipos San Martín y Amazonas, mientras que *P. brachybotrya* y *P. polyadenia* presentan bordes lisos, y *P. volubilis* ecotipo Cusco presenta borde aserrado. La base de las hojas son caudadas para todos los grupos excepto en *P. polyadenia* que presenta base acuminada. Muchas de las diferencias encontradas en campo



entre los distintos grupos en estudio y corroboradas en las muestras de herbario son muy sutiles y muchas veces no proporcionan la seguridad necesaria para diferenciar ciertos grupos, debido a que las principales diferencias entre las especies son encontradas a nivel de inflorescencia (las flores son fuertemente utilizadas en la identificación de especies porque son los órganos sujetos a menos plasticidad en las plantas). Estas diferencias florales entre las especies pueden ser establecidas sólo por experimentados taxónomos, pasando muchas veces desapercibidas en campo por los productores, mejoradores o extensionistas encargados de la difusión de estos cultivos. En las muestras depositadas en el herbario, estas dificultades puede que hayan sido observadas por otros grupos de investigadores, puesto que la identificación de varias muestras de herbario solo se encuentra a nivel de género. Esto posiblemente se deba a que muchas de estas muestras se encuentran incompletas limitando su identificación. En el campo se pudo también observar un carácter diferencial a nivel de la base del tallo en *P. polyadenia* y *P. volubilis* ecotipo Amazonas, estos grupos pueden presentar formas aplanada y hexagonal respectivamente, mientras que los otros cuatro grupos presentan formas redondeadas.

Las diferencias a nivel de fruto y semilla fueron las más notorias (Tabla 03; Fig. 09). El tamaño de la cápsula y las semillas, separan claramente los seis grupos. *Plukenetia brachybotrya* y *P. lorentensis* muestran dimensiones bastante menores cuando comparadas con los otros grupos, la superficie de sus semillas son lisas y el aspecto es redondeado para ambas especies; el carácter diagnóstico entre estas dos especies es la forma de la cápsula: en *P. lorentensis* cada carpelo tiene un cornículo agudo, y en *P. brachybotrya* cada

carpelo se muestra con tubérculo redondeado. Por otro lado, *P. polyadenia* es la especie que presentó el mayor tamaño para frutos (de 6 a 11 cm.) y semillas, estas semillas tienen forma redondeada, y la cápsula es de forma cuadrangular con ángulos quillados. Los tres ecotipos de *P. volubilis* se diferencian de las primeras especies por presentar semillas ligeramente aplanadas en el sentido vertical adquiriendo una forma elipsoidal. Los tres ecotipos de *Plukenetia volubilis* también presentan diferencias entre ellas, en cuanto al tamaño, las semillas del ecotipo San Martín son las de menor tamaño entre los tres grupos, en cuanto que la del ecotipo Amazonas es considerablemente la mayor entre los mismos. Así mismo las semillas del ecotipo San Martín son lisas a muy ligeramente rugosas y relativamente más aplanadas, en tanto que las semillas de los otros dos supuestos ecotipos son fuertemente rugosas y más elipsoidales. Esta plasticidad en los caracteres morfológicos ya fue observado por otros autores, en *P. volubilis* Manco (2006) reporta la existencia de 47 ecotipos y Arévalo (1995) indica que los ecotipos de *P. volubilis* presentan diferencias considerables en cuanto al área de follaje; tamaño y forma de sus hojas y semilla. Estas variaciones presentadas en los diferentes caracteres morfológicos imposibilitan una identificación taxonómica segura, siendo necesaria la utilización de otras herramientas como por ejemplo los marcadores moleculares, para verificar si las diferencias observadas entre los grupos, representan variabilidad del carácter (plasticidad) o diferencias entre especies próximas.

## 5.2. Identificación molecular y relaciones filogenéticas

Los marcadores moleculares son poderosas herramientas en la detección de polimorfismos a nivel de ADN, siendo frecuentemente utilizados para elucidar los límites taxonómicos entre especies hermanas (con caracteres diagnósticos sobrepuestos o confusos) o dentro de complejos de especies, donde más de una especie biológica está involucrada bajo una única unidad taxonómica (Chong & Khoo, 1987; Liu & Wendel, 2001; Chen *et al.*, 2007; Chennaoui-Kourda *et al.* 2007; Dávila, 2007). En especies donde existe un conocimiento previo del genoma, el secuenciamiento nucleotídico es el mejor marcador para el establecimiento de las diferencias entre las especies (Kelchner, 2000; Cameron *et al.*, 2001; Davis *et al.*, 2001; Steinmann & Porter, 2002; Wurdack *et al.*, 2005; Tokuoka & Tobe, 2006; Van Ee, 2006; Tokuoka, 2007). En especies donde no se posee este conocimiento previo de los marcadores, los primers universales son de gran utilidad, pues son informativos en un número grande de especies (Roa *et al.*, 2000; Rossetto, 2000; Olsen & Schaal, 2001; Bänfer, *et al.*2004; Okogbenin *et al.*, 2006).

En el caso de las especies del género *Plukenetia* no se encuentran reportados hasta el momento en la literatura marcadores moleculares específicos que pudieran ser utilizados en este estudio. Por lo que fue necesario recurrir a marcadores con primers universales como los marcadores ISSR que son cada vez más requeridos en estudios de plantas superiores, pues son reconocidos por ser abundantes, muy reproducibles, altamente polimórficos, es decir altamente informativos y fáciles de usar (Zietkiewicz *et al.*, 1994; Bornet & Branchard, 2001; Bornet *et al.*, 2002). Así mismo, los marcadores ISSR han sido utilizados para establecer diversidad genética,

identificar cultivares estrechamente relacionados, estudiar procesos evolutivos y biogeografía, así como aspectos relacionados con la ecología de algunas especies vegetales, y se ha establecido como herramienta molecular de mucha utilidad para estudios filogenéticos y de variaciones inter e intraespecíficas (Bahulikar *et al.*, 2004; Joshi *et al.*, 2000; Kimball *et al.*, 2001; Wolfe & Randle, 2001; Blattner *et al.*, 2001; Pivoriene, 2008; Roux *et al.*, 2007).

En este estudio se utilizaron cuatro marcadores ISSR, tres de estos marcadores (CAA, CAG y GACA) mostraron polimorfismo entre los seis grupos del género *Plukenetia*, lográndose determinar con éxito la diferenciación genética entre los grupos estudiados. Pudiéndose distinguir claramente mediante los resultados del análisis AFC la formación de seis grupos genéticos bien diferenciados, y fuertemente estructurados. Confirmando la identidad genética de cuatro especies de *Plukenetia* oficialmente descritas: *Plukenetia brachybotrya*, *P. lorentensis*, *P. polyadenia* y *P. volubilis*, mostrando además que los dos supuestos ecotipos de *Plukenetia volubilis* (Amazonas y Cusco) son entidades genéticas diferentes entre sí y de *Plukenetia volubilis* ecotipo San Martín; estos resultados fueron corroborados con los resultados de  $F_{st}$  (Tabla 07) y distancia genética (Tabla 08) donde se observa que los valores encontrados entre los tres supuestos ecotipos de *Plukenetia volubilis* en estudio (San Martín, Cusco y Amazonas) es similar a las encontradas entre las otras especies. Estos niveles de diferenciación genética ( $F_{st}$ ) entre los seis grupos de *Plukenetia* encontrados, son altos según la escala establecida por Hartl & Clark (1997), evidenciando la identidad genética de seis grupos distintos: *Plukenetia polyadenia*, *P. brachybotrya*, *P. lorentensis*, *P. volubilis* ecotipo San Martín, *P. volubilis* ecotipo Cusco y *P. volubilis* ecotipo Amazonas.

La literatura registra la utilización de marcadores ISSR en estudios de validación de la información proporcionada por la taxonomía morfológica. Por ejemplo, Chennaoui-Kourda *et al.* (2007) utilizando marcadores ISSR en el análisis del relacionamiento entre *Sulla spinosissima* y *S. capitata*, mostraron la existencia de una gran diferenciación genética entre estas dos especies con gran semejanza morfológica (especies crípticas). Shi *et al.*, 2006 realizaron análisis moleculares de 20 especies de *Lycoris*, reconociendo cuatro grandes grupos de especies lo que resultó congruente con sus observaciones morfológicas y citológicas; la técnica ISSR-PCR posee entonces un gran potencial para detectar diferencias genómicas en *Lycoris*. Asimismo, el marcador ISSR fue utilizado exitosamente para estudiar la variabilidad genética y diversidad clonal de 14 poblaciones de *Sagitaria natans* y *S. trifolia*, lográndose demostrar el alto nivel de diversidad genética entre las poblaciones de ambas especies (Chen *et al.*, 2007). Por otro lado, los marcadores ISSR, ITS (Internal Transcribed Spacer del DNA ribosomal) y AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) fueron también empleados en el estudio de las relaciones del complejo *Amaranthus hybridus* (tres especies cultivadas y sus parientes silvestres), encontrándose una baja divergencia con los marcadores ITS, en tanto que elevado polimorfismo con AFLP e ISSR, demostrando que tanto AFLP e ISSR o la combinación de ambos tienen un gran potencial para generar un cuantioso número de caracteres informativos para análisis filogenéticos de especies cercanamente relacionadas (Xu & Sun, 2001). Resultados similares acerca de marcadores ISSR fueron encontrados en trigo, cebada y algodón (Yockteng *et al.*, 2003; Raina *et al.*, 2001; Hang *et al.*, 2003; Liu, 1999). Así mismo la agrupación Angiosperm Phylogeny Group (APG),

viene apoyando desde la década de los noventa la tendencia de emplear el uso de marcadores moleculares en estudios filogenéticos de plantas, principalmente con la finalidad de proporcionar una nueva visión filogenética en la sistemática de plantas con flores.

El dendograma obtenido a partir de las distancias genéticas (Reynolds, Weir & Cockerham; 1983) para las especies amazónicas del género *Plukenetia* muestra la formación de dos agrupaciones principales (clados principales): la primera conformada por los tres supuestos ecotipos de *Plukenetia volubilis*, siendo que los ecotipos Amazonas y San Martín se encuentran más cercanamente relacionados (distancia genética =2.26). La segunda agrupación engloba a *Plukenetia polyadenia*, *Plukenetia loretensis* y *P. brachybotrya*, siendo que estas dos últimas se encuentran más relacionadas en la topología (distancias genéticas: *P. brachybotrya* y *P. loretensis* =3.22). Estas agrupaciones genéticas encontradas parecen presentar afinidad en la forma de la semilla, en el caso de la primera agrupación es relativamente aplanada, en cuanto que la segunda agrupación presenta semillas redondeada en las tres especies. Al contrario de la clasificación de las *Plukenetia* neotropicales (basado entre otros caracteres por el tamaño del fruto) sugerida por Gillespie (1993), donde *P. polyadenia* se encuentra junto a *P. volubilis* en el grupo *Cylindrophora*. Las relaciones obtenidas en este trabajo muestran que *Plukenetia polyadenia* se encuentra más cercana de *P. brachybotrya* y *P. loretensis* que son especies que presentan semillas pequeñas (media: *P. loretensis* = 0.51 x 0.42 cm; *P. brachybotrya* = 0.41 x 0.39 cm), demostrando que el tamaño de los frutos no puede ser considerado como carácter diagnóstico (diferencial) para agrupar las especies estudiadas.

## VI. CONCLUSIONES

- ✓ ISSR-PCR es una técnica eficiente en el estudio de la filogenia de las especies del género *Plukenetia* reportadas para el Perú, mostrando alto nivel de polimorfismo entre los seis grupos estudiados, revelado en una fuerte diferenciación genética entre estos.
- ✓ La técnica ISSR-PCR permitió corroborar la identidad taxonómica de cuatro especies del género *Plukenetia*: *P. brachybotrya*, *P. lorentensis*, *P. polyadenia* y *P. volubilis* (denominado en este estudio como ecotipo San Martín).
- ✓ El uso de los marcadores moleculares ISSR en *Plukenetia* permiten validar la información de la taxonomía morfológica, resultando congruente con las observaciones de la morfología de diversas estructuras vegetales.
- ✓ Los resultados obtenidos en este estudio mediante marcadores moleculares (ISSR) y los caracteres morfológicos entre los tres supuestos ecotipos de *Plukenetia volubilis*, indica que estos tres grupos representan entidades genéticas separadas y no diferentes poblaciones dentro de *P. volubilis*, como supuesto antes de este estudio.

## **VII. RECOMENDACIONES**

- 1. En estudios futuros utilizar secuenciamiento nucleotídico para poder analizar con mayor profundidad el grado de monofilia del género, incluyendo algunos grupos externos.**
- 2. Realizar estudios sobre filogeografía de uno o más grupos que permitan ver el estado de conservación dentro de las especies y comparar los modelos evolutivos entre ellas.**



## VIII. RESUMEN

En la Amazonía peruana la familia Euphorbiaceae presenta especies de gran interés para su aprovechamiento; siendo *Plukenetia volubilis* "sachainchi" una especie que recientemente ha comenzado a ser explotada en diversas regiones del país; pero en el proceso de expansión del recurso se han agrupado bajo la denominación "sachainchi" numeroso material biológico de diversas procedencias y con diferencias morfológicas notables, pudiéndose así confundir especies emparentadas del mismo género bajo una misma especie. Este trabajo pretende contribuir a elucidar los límites taxonómicos entre las especies del género *Plukenetia* (*Plukenetia brachybotrya*, *P. lorentensis*, *P. polyadenia*, *P. volubilis* con tres supuestos ecotipos: Amazonas, Cusco y San Martín) reportadas para la Amazonía peruana. Para lo cual se colectaron muestras de 20 individuos por cada agrupación, los análisis se realizaron tanto a nivel morfológico (formas de hojas, tallos y semilla; posición de glándulas basilaminares) como molecular (marcadores moleculares ISSR, primers: CAA, CAG, GACA). Las observaciones morfológicas de los diferentes grupos estudiados permitió identificar con certeza cuatro especies: *Plukenetia brachybotrya*, *P. lorentensis*, *P. polyadenia* y *P. volubilis* (ecotipo San Martín). Asimismo se observó que *P. volubilis* (ecotipo San Martín) presenta diferencias morfológicas en la posición de las glándulas, tamaño de semillas y forma del tallo con los otros dos supuestos ecotipos de esta especie (Amazonas y Cusco). Los datos proporcionados por el AFC y corroborados por  $F_{st}$ , distancia genética, y los dendogramas estimados por el método UPGMA y de parsimonia de Wagner, evidencian una fuerte diferenciación entre los seis

grupos, corroborando la identidad taxonómica de cuatro especies oficialmente descritas para la Amazonía peruana: *Plukenetia brachybotrya*, *P. lorentensis*, *P. polyadenia* y *P. volubilis*. Asimismo se constató que las diferencias morfológicas observadas entre los tres supuestos ecotipos de *P. volubilis* tienen una base genética sólida (resultados de  $F_{st}$ , distancias genéticas encontrados entre los ecotipos son similares a las encontradas entre las cuatro especies oficialmente descritas), sugiriendo que estas agrupaciones no son solamente poblaciones aisladas de una misma especie, sino especies taxonómicas diferentes.

Palabras clave: *Plukenetia*, sachainchi, límites taxonómicos, marcadores moleculares

ISSR

## IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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. APG, The Angiosperm Phylogeny Group. 2003. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 2003, 141, 399–436.
3. Ayala, F. 1999. Inventario Taxonómico de la Flora de la Amazonía Peruana. Herbarium Amazonense. Iquitos, Perú. 198 pp.
4. Arévalo, G. 1995. El cultivo del sachá 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. Bahulikar, R.; Stanculescu, D.; Preston, C.; Baldwin, I. 2004. ISSR and AFLP analysis of the temporal and spatial population structure of the post-fire annual, *Nicotiana attenuata*, in SW Utah, *BMC Ecology* 2004, 4:12
6. Bänfer, G.; Fiala, B.; Weising, K. 2004. AFLP analysis of phylogenetic relationships among myrmecophytic species of *Macaranga* (Euphorbiaceae) and their allies. *Plant Syst. Evol.* 249: 213–231.
7. 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.

8. Blattner, F. R. ;Weising, K.; Bänfer, G; Maschwitz, U.; Fiala, B. 2001. Molecular analysis of phylogenetic relationships among myrmecophytic *Macaranga* Species (Euphorbiaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* Vol. 19, No. 3, June, pp. 331–344.
9. Brack, A. 1999. *Plukenetia volubilis* L. Diccionario Enciclopédico de Plantas Útiles del Perú. PNUD. Cuzco – Perú. 550 p.
10. Bussell, J.D.; Waycott, M; Chappill; J. A. 2005. Arbitrarily amplified DNA markers as characters for phylogenetic inference. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* 7 (2005) 3–26.
11. Bornet, B.; Branchard, M. 2001. Non anchored Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) Markers: Reproducible and Specific Tools for Genome Fingerprinting; *Plant Molecular Biology Reporter* 19: 209–215, 2001.
12. Cameron, K. M.; Chase, M. W.; Anderson, W. R.; Hills, H. G. 2001. Molecular Systematics of Malpighiaceae: Evidence from Plastid *rbcl* and *matK* Sequences. *American Journal of Botany*, Vol. 88, No. 10. (Oct., 2001), pp. 1847-1862.
13. Chen, J.; Gituru, W.R.; Wang, Q. 2007. A comparison of the extent of genetic variation in the endangered *Sagittaria natans* and its widespread congener *S. trifolia*. *Aquatic Botany* 87 (2007) 1–6
14. Chennaoui-Kourda, H.; Marghali, S.; Marrakchi, M.; Trifi-Farah, N. 2007. Genetic diversity of *Sulla* genus (*Hedysarea*) and related species using Inter-simple Sequence Repeat (ISSR) markers. *Biochemical Systematics and Ecology* 35 (2007) 682e688.

15. Chong, S. C.; Khoo, H. W. 1987. Abreviated larval development of the freshwater prawn, *Macrobranchium pilimanus* (de Man, 1879) (Decapoda, Palaemonidae), reared in the laboratory. *Journal of Natural History*, 21: 763-774.
16. Dávila, M.; Castillo, M. A.; Laurentin, H.; Uso de marcadores moleculares ISSR para inferir las relaciones genéticas y la variabilidad intraespecífico en *Agave*. *Rev. Fac. Agron. (Maracay)* 33:93-111. 2007.
17. Davis, Ch. C.; Anderson, W. A.; Donoghue, M. J. 2001. Phylogeny of Malpighiaceae: Evidence from Chloroplast *ndhF* and *trnL-F* Nucleotide Sequences. *American Journal of Botany*, Vol. 88, No. 10. (Oct., 2001), pp. 1830-1846.
18. Doyle, J. J.; Doyle J. L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.*, 19:11-15.
19. Eck, R. V.; Dayhoff, M. O. 1966. Atlas of protein. Sequence and structure. National Biomedical Research Foundation. Silverspring, Maryland.
20. Fang, D. Q. & Roose, M. L. 1997 Identification of closely related citrus cultivars with inter-simple sequence repeat markers. *Theor Appl Genet* (1997) 95: 408-417.
21. Felsenstein, J. 1993. PHYLIP (Phylogeny Inference Package), version 3.5 c. Seattle: University of Washington.
22. Ferreira, M. E.; Gratapaglia, D. 1998. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3ª ed. Brasília: EMBRAPA – CENARGEN, 1998. pp. 220.

23. García Muriana F. J. 2002. Metabolismo de los Ácidos Grasos. En: Libro blanco de los omegas-3. Ed. Puleva Food. Granada.
24. Gazel, C. 1999. Variabilite genetique de formes cavernicoles et epigees de *Trichomycterus* (Teleosteens, Siluriformes) de la region de Torotoro (Potosí-Bolivia). Effect de l' habitat sur la structuration genetique des populations. Universite de Provence Aix-Marseille I.
25. 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 – Conseravation International. Washington, D.C. - USA. 95 pp.
26. Gillespie, L. J. 1993. A synopsis of Neotropical *Plukenetia* (Euphorbiaceae) including two new species. *Systematic Botany* 18 (4): pp. 575 – 592.
27. Gillespie, L. J. 1994. Pollen morphology and phylogeny of the Tribe Plukenetieae (Euphorbiaceae). *Ann. Missouri Botanical Garden*. 81: pp. 317 – 348.
28. 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.
29. Gillespie, L. 2007. A revision of paleotropical *Plukenetia* (Euphorbiaceae) including two new species from Madagascar. *Systematic Botany* 32 (4): pp. 780-802.

30. Godwin, I.; Aitken, E.; Smith, L. 1997. Application of inter simple sequence repeat (ISSR) markers to plant genetics. *Electrophoresis*. 1997. Aug; 18(9):1524-8.
31. González-Guzmán, M.; Medina-Herranz, M.A.; Medina-Herranz, M.; Palomares-Hernández, G. 2006. Identificación y selección de marcadores moleculares Intermicrosatelite (ISSR) para la diferenciación varietal en *Capsicum annum* L.
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 <sup>1</sup>H NMR. Comparison with Linseed Oil.
33. 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.* 69:461–463.
34. Hang A., Burton, C.S., Hoffman, D.L., 2003. Use of intersimple sequence repeat (ISSR) polymorphisms to study genetic relationships in closely related North American malting barley cultivars. *J. Genet. Breed.* 91, 16–21.
35. Hartl, D. & Clarrk, A. 1997. Principles of population genetics. Sinauer Associates, Inc. Publishers Sunderland, Massachussets. 683 pp.
36. Incagro, Innovación y Competitividad para el Agro Peruano. 2006. Boletín Técnico. Portal Agrario Ministerio de Agricultura. Lima – Perú.

37. IPGRI, International Plant Genetic Resources Institute & Cornell University. 2003. Tecnologías de marcadores moleculares para estudios de diversidad genética de plantas: Módulo de aprendizaje.
38. Joshi, S; Gupta, V; Aggarwal, R.; Ranjekar, P; Brar, D. 2000. Genetic diversity and phylogenetic relationship as revealed by inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism in the genus *Oryza*. *Theor. Appl. Genet.* (2000) 100:1311–1320.
39. Judd, W.; Campbell, C.; Kellogg, E.; Stevens, P. 1999. *Plant Systematics: A Phylogenetic Approach*. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, MA, USA. 464 pp.
40. Kalliola, R. 1993. Amazonía Peruana, vegetación húmeda tropical en el llano subandino. Proyecto Amazonía, Universidad de Turku; Turku, Finlandia. 265 pp.
41. Kelchner, S. 2000. The Evolution of Non-Coding Chloroplast DNA and Its Application in Plant Systematics. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, Vol. 87, No. 4. (Autumn, 2000), pp. 482-498.
42. Kimball, R.; Crawford, D.J.; Page, J.R.; Harmon, P.J. 2001. Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) Diversity within *Monarda fistulosa* var. *brevis* (Lamiaceae) and divergence between var. *brevis* and var. *fistulosa* in West Virginia. *Brittonia*, Vol. 53, No. 4 (Oct. - Dec., 2001), pp. 511-518
43. Kluge A. G. & Farris J. S. 1969. Quantitative phyletics and evolution of anurans. *Systematic Zoology*
44. Kothe M., S. 1998. Marcadores Moleculares em Plantas. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, RS, Brasil. 137 pp.



45. Liu, S., 1999. Cotton genetic mapping and QTL analysis using simple sequence repeat markers and the identification of their chromosome location. MS Thesis. New Mexico State University, Las Cruces, NM.
46. Liu, B.; Wendel, J. 2001. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphisms as a genetic marker system in cotton, *Molecular Ecology Notes* 1 (3), 205–208.
47. Manco, E. 2006. Cultivo de sacha inchi. INIEA – SUDIRGEB – Estación Experimental Agraria “EL PORVENIR”, Tarapoto, San Martín – Perú.
48. Matioli, S. R (ed.). 2001. *Biologia Molecular e Evolução*, Holos Editora. Riberão Preto – Brasil. 202 pp.
49. Mejía, K., 1995. Diagnostico de recursos vegetales de la amazonia peruana. Instituto de Investigaciones de la Amazonia Peruana. Documento técnico N°16.
50. Mobot, Missouri Botanical Garden. 2007. Saint Louis, Missouri, EUA  
<http://mobot.mobot.org/W3T/Search/vast.html>
51. Nagaoka T & Ogihara Y (1997) Applicability of inter-simple sequence repeat polymorphisms in wheat for use as DNA markers in comparison to RFLP and RAPD markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 94, 597-602.
52. Nei, M. 1996. Phylogenetic analysis in molecular evolutionary genetics, *Annual Reviews Genetics*. 1996. 30: 371 - 403.
53. Okogbenin, E.; Marin, J.; Fregene, M. 2006. An SSR-based molecular genetic map of cassava. *Euphytica* (2006) 147: 433–440.

54. Olsen, K. M. & Schaal, B. A. 2001. Microsatellite variation in cassava (*Manihot esculenta*, Euphorbiaceae) and its wild relatives: further evidence for a southern amazonian origin of domestication. *American Journal of Botany* 88(1): 131–142.
55. 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.
56. Pascual, G. 2000. Extracción y Caracterización de Aceite de Sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.). *Anales Científicos*, Enero - Marzo 2000, Volumen: XLII, Pág. 144-158.
57. Pradeep Reddy, M.; Sarla, N.; Siddiq, E.A. 2001. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica* 128: 9–17, 2002.
58. Pivorienė, O.; Pašakinskienė, I.; Brazauskas, G.; Lideikytė, L. Jensen, L. B.; Lübberstedt, T. 2008. Inter-simple sequence repeat (issr) loci mapping in the genome of perennial ryegrass. *BIOLOGIJA*. 2008. Vol. 54. Nr. 1. P. 17–21
59. Raina, S.N. ; Rani, V.; Kojima, T.; Ogiwara, Y.; Singh, K.P.; Devarumath, R. M. 2001. RAPD and ISSR fingerprints as useful genetic markers for analysis of genetic diversity, varietal identification, and phylogenetic relationships in peanut (*Arachis hypogaea*) cultivars and wild species. *Genome* 44: 763–772 (2001).

60. Reynolds, J.; Weir, B. S.; Cockerham, C. C. 1983. Estimation of coancestry coefficient: basis for a short-term genetic distance. *Genetics* 105: 767-779.
61. Roa, A.C.; Chavarriaga-Aguirre, P.; Duque, M.C.; Maya, M. A.; Bonierbale, M. W.; Iglesias, C.; Tohme, J. 2000. Cross-Species amplification of cassava (*Manihot Esculenta*) (Euphorbiaceae) microsatellites: allelic polymorphism and degree of relationship. *American Journal of Botany* 87(11): 1647–1655.
62. Rossetto, M.; McNally, J.; Henry, R. J.; Hunter, J.; Matthes; M. 2000. Conservation genetics of an endangered rainforest tree (*Fontainea oraria* – Euphorbiaceae) and implications for closely related species. *Conservation Genetics* 1: 217–229.
63. Roux, O.; Gevrey, M.; Arvanitakis, L.; Gers, C.; Bordat, D.; Legal, L. 2007. ISSR-PCR: Tool for discrimination and genetic structure analysis of *Plutella xylostella* populations native to different geographical areas. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 43 (2007) 240–250.
64. Seigler, D. S., 1994. Phytochemistry and Systematics of the Euphorbiaceae. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, Vol. 81, No. 2, (1994), pp. 380-401
65. Shi, S.; Qiu, Y.; Wu, L.; Fu, Ch.. 2006. Interspecific relationships of *Lycoris* (Amaryllidaceae) inferred from inter-simple sequence repeat data. *Scientia Horticulturae* 110 (2006) 285–291.
66. Steinmann; V. W. & Porter, J.M. 2002. Phylogenetic relationships in Euphorbieae (Euphorbiaceae) based on ITS and ndhF sequence

data *Annals of the Missouri Botanical Garden*, Vol. 89, No. 4, (Autumn, 2002), pp. 453-490

67. Tokuoka T., Tobe H. 2006. Phylogenetic analyses of Malpighiales using plastid and nuclear DNA sequences, with particular reference to the embryology of Euphorbiaceae sens. str. *J Plant Res* (2006) 119:599–616
68. Tokuoka T. 2007. Molecular phylogenetic analysis of Euphorbiaceae sensu stricto based on plastid and nuclear DNA sequences and ovule and seed character evolution. *J Plant Res* (2007) 120:511–522.
69. Van Ee, B. W.; Jelinski, N.; Berry, P. E.; Hipp, A. 2006. Phylogeny and biogeography of *Croton alabamensis* (Euphorbiaceae), a rare shrub from Texas and Alabama, using DNA sequence and AFLP data. *Molecular Ecology* (2006) 15, 2735–2751.
70. Vásquez, R. 1997. *Flórmula de las Reservas de Iquitos. Perú*. The Missouri Botanical Garden Press, St Louis – MI, USA. 1046 pp.
71. Weir, B.S. 1991. *Genetic data analysis*. Sinauer, Sunderland, MA.
72. Weir, B.S. & Cockerham, C. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. In: *Evolution*, Vol. 38, 1358-1370p.
73. Wolfe, A. D. & Randle, Ch. P. 2001. Relationships within and among species of the holoparasitic Genus *Hyobanche* (Orobanchaceae) inferred from ISSR banding patterns and nucleotide sequences. *Systematic Botany*, Vol. 26, No. 1 (Jan. - Mar., 2001), pp. 120-130
74. Wurdack, K.; Hoffmann, P.; Chase, M. W. 2005. Molecular phylogenetic analysis of uniovulate Euphorbiaceae (Euphorbiaceae sensu stricto)

- using plastid *rbcl* and *tmi-f* dna sequences. American Journal of Botany 92(8): 1397–1420.
75. Xu, F. & Sun, M. 2001. Comparative Analysis of Phylogenetic Relationships of Grain Amaranths and Their Wild Relatives (*Amaranthus*; Amaranthaceae) Using Internal Transcribed Spacer, Amplified Fragment Length Polymorphism, and Double-Primer Fluorescent Intersimple Sequence Repeat Markers. Molecular Phylogenetics and Evolution. Vol. 21, No. 3, December, pp. 372–387, 2001.
76. Yockteng, R.; Ballard, H. E.; Mansion, G.; Dajoz, I.; Nadot, S. 2003. Relationships among pansies (*Viola* section *Melanium*) investigated using ITS and ISSR markers. Plant Syst. Evol. 241: 153–170 (2003).
77. Zapata, S. 2001. Posibilidades y potencialidad de la agroindustria en el Perú en base a la biodiversidad y los bionegocios. Comité Biocomercio Perú. Lima – Perú. 70 pp.
78. Zietkiewicz, E; Rafalski, A.; Labuda, D. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification, Genomics Volume 20, Issue 2 , March 1994, Pages 176-183.

# **ANEXOS**

## **ANEXO 01: CLAVE DE LAS ESPECIES NEOTROPICALES DE *Plukenetia***

**(Gillespie, 1993)**

1. Hoja pennadamente nervadas, agudo, obtuso o redondeado en la base; protuberancia glandular ausente en la base de la nervadura central, estipelas presente sólo en *P. serrata*; glándulas laminares dispersas por lo general presente en la superficie inferior de la hoja (excepto en *P. penninervia* y *P. serrata*); estilos totalmente connados, 1-4 mm de longitud; todas las anteras sésiles o estambres dimorfos con anteras interiormente sésiles y exteriormente con filamentos cortos.
2. Fruto 4 cm. o más de diámetro, carnosa; flores pistiladas 1-10 por inflorescencia; todas las anteras sésiles y dispersas en receptáculo globoso, recipiente de 2 mm o más en diámetro., claramente visible entre anteras; columna estilar masivo-obovoide; par de estipelas presentes adaxialmente en la base del nervio central.....*P. serrata*
2. Fruto 1-2 cm de diámetro, capsular; 1 flor pistilada por inflorescencia; todos o sólo algunas anteras sésiles y densamente hacinados en receptáculo globoso, receptáculo de menos de 1 mm de diámetro, no visible entre anteras; columnas estilares diversas; estipelas ausentes.
3. Estambres de un tipo: 15-50 anteras sésiles sobre receptáculo globoso; columna estilar masivo-globosa o cilíndrico-delgada, (1) 2-4 mm de longitud.

4. Columna estilar delgada-cilíndrica, ovario y cápsula con cuerno en punta en cada carpelo; 15-25 estambres; glándulas basilaminares en 1 a varios pares.....***P. lorentensis***
4. Columna estilar masivo-globosa, ovario y cápsula con tubérculo redondeado en cada carpelo; estambres (24) 30-50; un solo par de glándulas basilaminares.....***P. brachybotrya***
3. Estambres de dos tipos: verticilo exterior de 4 (5) estambres con filamentos, grupo interior de 6-12 anteras sésiles sobre receptáculo globoso; columna estilar sólido- cilíndrica, 1-2 (3) mm de largo.
5. Glándulas basilaminares en 3-5 pares; brotes jóvenes y pecíolos densamente hirsutos; hojas inferiores hirsutas, pelos persistentes.....***P. multigaldulosa***
5. Glándulas basilaminares en 1-2 (3) pares; brotes jóvenes y pecíolos puberulentos; hoja escasamente puberulenta por debajo, a menudo llegando a ser glabros.
6. Glándulas laminares dispersas ausentes o rara vez 1-8 cerca del margen solamente en la superficie inferior de la de la hoja; hoja cartácea a coriácea, mayormente subcoriácea, margen claramente serrulado y a menudo glándulas bien distinguibles; inflorescencia 1-3 cm de largo (a sólo 6 cm en Colombia).....***P. penninervia***
6. Glándulas laminares dispersas numerosas, presente en ambas superficies, superior e inferior, de la hoja; hoja cartácea, margen claramente serrulada, apariencia



ondulada, glándulas nunca distinguibles, inflorescencia 2-8  
cm de largo.....***P. supragaldulosa***

1. Hoja palmadamente nervada o trinervada, cordada, redondeada, o en general obtusa en la base; protuberancia glandular o estipelas presentes adaxialmente en la base del nervio central; glándulas laminares dispersas ausentes en la superficie inferior de la hoja; estilos parcial o totalmente connados, 1.5-30 mm de longitud; todos los estambres con filamentos definidos o estambres dimorfos con anteras interiores sésiles (sólo en *P. verrucosa*).

7. Columna estilar globosa, 1.5-2 mm de largo, estilos totalmente connados; estambres exteriores con filamentos, antera sésiles interiores; frutos menos de 1,5 cm de diámetro., 4-lobadas, capsular.....***P. verrucosa***

7. Columna estilar cilíndrica, 2-30 mm de largo, estilos solo parcialmente connados (a veces libre sólo en la punta); todos los estambres con filamentos; frutos más de 2,5 cm de diámetro, 4-lobadas o subgloboso, carnosa o capsular.

8. Estilos libres para una mitad o más de longitud, columna 3-6 mm de longitud, brazos 3-6 mm de largo; 5 sépalos estaminados; segmentos de discos ligulados (en forma de correa) entre estambres; fruto subgloboso, cuadrangular y en secciones transversales.....***P. lehmanniana***

8. Estilos libres para menos de la mitad de la longitud, columna 2-30 mm de largo, brazos 1-2.5 (3) mm de largo; 4 ó 5 sépalos

estaminados; segmentos de discos estaminados ausentes, o si están presentes diminutos y no ligulados; frutos varios.

9. Columna estilar 3-7 mm de largo; fruto subgloboso, cuadrangular y en secciones transversales, superior a 6 cm de diámetro, indehiscente; yema estaminada estrechamente oblongo-elipsoide; filamentos de 2-2.5 mm de longitud; inflorescencia mayormente unisexual, dimorfo, inflorescencia pistilada con 3-4 (10) flores, base de hoja redondeada o ampliamente obtuso.....***P. polyadenia***

9. Columna estilar 6-30 mm de largo; fruto 4-lobado, 2.5-4 (6) cm de diámetro, dehiscente; yema estaminada subglobosa; filamentos de 0.4-1.2 mm de longitud; inflorescencia bisexual con una o dos flores pistiladas en nodos basales; base de hoja cordada o truncada.

10. Par de estipelas presentes adaxialmente en el ápice del pecíolo; protuberancia glandular diminuta o ausente entre estipelas; estambres 25-40, filamentos delgados, 1-1.2 mm de longitud; columna estilar 6-11 mm de longitud; 5 sépalos estaminados, raramente 4.....***P. stipellata***

10. Par de estipelas ausentes, protuberancia glandular única presente adaxialmente en el ápice del pecíolo; estambres 16-30, filamentos sólido-cónicos, 0.4-0.5 mm de longitud; columna estilar 15-30 mm de longitud; 4 sépalos estaminados.....***P. volubilis***

**ANEXO 02: DESCRIPCIONES DE LAS ESPECIES DEL GÉNERO *Plukenetia*  
REPORTADAS PARA EL PERÙ (Gillespie & Armbruster, 1997;  
Gillespie, 1993)**

**1.-*Plukenetia volubilis* L., 1753**

**Descripción.** Soga o liana delgada, monoica. Tallo glabrescente a pubescente; tallos jóvenes pubescentes. Pecíolo 2.5-7.5 cm de longitud, glabro a escasamente pubescente; hoja cartácea o membranosa, triangular-ovada, 7-13(-18) 4-10(-18) cm, ápice largo-acuminado con acumen de 1-2 cm de longitud, base truncada a cordada, por debajo glabrescente, trinervada en la base; par de glándulas basilaminares, circular a lateralmente elongada, 1.5-3 mm de ancho, frecuentemente con pequeña protuberancia en medio, glándulas laminares dispersas ausentes. Inflorescencia axilar o terminal en pequeño vástago, racemosa, 5-18 cm de longitud, ejes poco a moderadamente pubescente, flores pistiladas 1 o raramente 2 en el (los) nudo(s) basal(es), flores estaminadas numerosas en cimas condensadas superiores; brácteas estrechamente triangulares, 1.5-2.5 mm de longitud. Pedicelo estaminado 2-3 mm de longitud, yema subglobosa, aproximadamente 2 mm de longitud, ápice redondeado a obtuso; 4 sépalos, ovado-elíptico, alrededor de 2 mm de longitud, ápice agudo, glabro; disco ausente; estambres 20-25(-28) sobre receptáculo convexo; filamentos aproximadamente 0.5 mm de longitud, dilatado en la base, atenuado en el ápice. Pedicelo pistilado aproximadamente 1.5 mm de longitud; 4 sépalos, linear-triangulado, 1.5-4 mm de longitud, glabro; ovario 4-alado, 1.5-2.5 x 3-5 mm, glabro; columna estilar elongada-cilíndrica, 15-30 x 0.7-1.5 mm, 4-lobada en el ápice, brazos aproximadamente 1mm (raramente a 3mm) de longitud, frecuentemente encorvado adaxialmente. Cápsula

profundamente 4-lobada, 1.5-2.5 x 2.5-4(-6) cm, glabro, inicialmente carnosa, siendo leñoso y dehiscente, cada carpelo con ala central de 2 mm de ancho. Semillas lenticulares, ampliamente oblonga en el contorno, 1.6-2 x 0.7-0.9 x 1.5-1.7 cm, marrón con un curso marcado de marrón oscuro.

## **2.-*Plukenetia polyadenia* Muell. Arg., 1874**

**Descripción.** Liana trepadora del dosel, dioica o a veces monoica. Ramificaciones glabras a poco pubescentes, a menudo emparejamiento. Pecíolo 1.5-5 cm de largo, glabros; lamina foliar cartácea a subcoriácea, elíptica a oval-elíptica, 7-11 (-14) x 4-7 (-10) cm, ápice obtuso-acuminado, con acumen delgado 0.6-1.5 cm de largo, base redondeada a obtusa, glabra, trinervada en la base, 1 par de glándulas basilaminares (rara vez 2 pares), transversalmente elíptica, aproximadamente 1.5-2 mm de ancho, presenta pequeño bulto en medio, glándulas laminares dispersas ausentes. Inflorescencias axilares, racemosas o a veces panícula, usualmente unisexual, ejes pubescentes; inflorescencia estaminal 5-25 (raramente hasta 35) cm de longitud, flores numerosas en cima circinada (escorpioide) o ramas laterales dicasial-escorpioide 0.2-2 cm de longitud, flores pistiladas ocasionalmente presentes en base mayor de los nodos 1-2 en una de otra inflorescencia estaminal; inflorescencia pistilada 1.5-3 (rara vez hasta 7) cm de longitud, flores 3-4 (-10), 1 o raramente 2 por rama lateral cimosa 0.2-2 cm de longitud, cada uno de estos 1-3mm de longitud; brácteas triangulares, aproximadamente 1 mm de longitud, ápice acuminado. Pedicelo estaminado 2-4mm de longitud, yemas estrechamente oblongo-elipsoide u oblongo-elipsoide, aproximadamente 3 mm de longitud, ápice agudo; 4 sépalos, estrechamente

oblongo, 3-4 mm de longitud, ápice agudo, glabro, encorvado en antesis; estambres 20-25 en receptáculo escamoso, convexo; filamentos 2-3 mm de largo, delgados, atenuados en el ápice: pedicelo pistilado 0.5-1 mm de longitud, glabro a poco pubescente, 4 sépalos, triangular, 0.5-1 mm de longitud, glabro, formando el ovario, ovario 4-angulado, aproximadamente 1.5 x 2 mm, no diferenciablemente alado o lobado, glabro; estilos connados en una columna estrecho-cónica, 3-7 mm de longitud, libres en el ápice, brazos 1.5-2.5 de largo, divergente. Infrutescencia mayor de 8 cm de longitud; baya subglobosa, cuadrangular en secciones transversales, cada ángulo claramente quillado, 6-10 cm de longitud 6-11 cm de diámetro, glabro, caroso, indehiscente, con una amplia protuberancia cónica apical aproximadamente 0.5 cm de longitud. Semillas ovoides, 4.9-5.6 x 3.3-3.7 x 3.0-3.5 cm, ápice reducido, base redondeada, marrón opaco, superficie áspera.

### **3.- *Plukenetia lorentensis* Ule, 1908**

**Descripción.** Soga o liana, monoicas. Tallos jóvenes, tomentoso, convirtiéndose en poco pubescente. Pecíolo 0.5-2 cm de largo, tomentoso; hoja cartácea, elíptica, 6-12 (-16) x 3-7 (-9) cm, ápice acuminado, base aguda a obtusa y poco decurrente, margen serrulado, glabrescente a escasamente pubescente por encima y por debajo de las principales venas, pennadamente nervadas; 2-4 pares de glándulas basilaminares, circular, aprox. 1 mm de diámetro, o a veces confluyentes en un único par alargado, aproximadamente 3 mm de largo, sobre la base de hoja decurrente; glándulas laminares dispersas, circulares, aproximadamente 0.5 mm de ancho, cerca del margen. Inflorescencias axilares, racemosas, 1-6 cm de largo, ejes poco a densamente

tomentosos; flor pistilada única en la base, flores estaminadas en cimas condensadas en posición superior; brácteas oval-trianguares, aproximadamente 1 mm de longitud, poco pubescente. Pedicelo estaminado 4-8 mm de largo, tomentoso; brotes subglobosos, aproximadamente 1,5 mm de largo, ápice obtuso; 4 sépalos, ovado-elíptico, 2-2.5 mm de longitud, escasamente pubescente; 15-25 anteras sésiles en receptáculo globoso. Pedicelo pistilado 2-3 mm de longitud, tomentoso; sépalos triangulares, alrededor de 0.7 mm de longitud, poco pubescente, formando parte del ovario; ovario con 4 astas o cuernos, 1-1.5 x 2.3 mm, densamente tomentoso a excepción de de las astas; estilo cilíndrico, 2.4 x 0.5 mm (aproximadamente), escasamente tomentoso; estigma 4-lobado, alrededor de 1 mm de ancho. Cápsula 4-lobada, 0.5-0.7 x 1-1,2 cm, puberulenta, dehiscente, cada carpelo lóbulo (carpelo) con cuerno puntiagudo, 3-6 mm de largo. Semillas subglobosas a ampliamente lenticular, 5-6 x 3,5-5 x 4.5-5.5 mm, moteado pálido y marrón oscuro con curso de reticulaciones oscuras.

#### **4.- *Plukenetia brachybotrya* Muell. Arg., 1865**

**Descripción.** Hoja pennatinervia, aguda, obtusa o redondeada en la base; protuberancia glandular ausente en la base de nervadura central, estipelas ausentes; glándulas laminares dispersas presente en la superficie inferior de la hoja; estilos totalmente connados, 1-4 mm de largo; todas las anteras sésiles o estambres dimorfos con anteras interiormente sésiles y exteriormente con filamentos cortos. Frutas 1-2 cm de diámetro, capsular; 1 flor pistilada por inflorescencia; todos o sólo algunas anteras sésiles y densamente hacinados en receptáculo globoso, receptáculo de menos de 1 mm de diámetro, no visible

entre anteras; columnas estilares diversas; estipelas ausentes. Estambres de un tipo: 15-50 anteras sésiles sobre receptáculo globoso. Columna estilar masivo-globosa, ovario y cápsula con tubérculo redondeado en cada carpelo; estambres (24) 30-50; un solo par de glándulas basilaminares.

### ANEXO 03: PREPARACIÓN DE GELES DE POLIACRILAMIDA

Gel de poliacrilamida al 6%

Preparar el gel en una probeta, y mezclar por inversión suave (5 veces) la solución del gel cada vez que se agregue un reactivo.

Reactivo	Conc. Inicial	Conc. Final	Vol. Gel
Agua MQ	-	-	34.3 ml
Buffer TBE	10 X	1X	5.0 ml
Poliacrilamida	30%	6%	10 ml
APS	10%	0.13%	656 µl
TEMED	100%	0.0094%	47 µl
<b>TOTAL</b>			<b>50 ml</b>

### ANEXO 04: TINCIÓN RABAT (ARGÉNTICA)

Procedimiento:

1. Sumergir el gel en **Alcohol Medicinal al 30%** durante **10 minutos**. Realizar movimientos suaves.
2. Descartar el Alcohol medicinal y hacer un **(01) lavado de 03 minutos** con agua destilada. Realizar movimientos suaves.
3. Sumergir el gel en **Ácido Nítrico al 1%** durante **3 minutos**. Realizar movimientos suaves.
4. Descartar el Ácido Nítrico y hacer un **(01) lavado** con agua destilada. Realizar movimientos suaves.
5. Sumergir el gel en **Nitrato de Plata 0.2%** durante **3 minutos**. Realizar movimientos suaves.
6. Descartar el Nitrato de Plata y hacer tres **(03) lavados** con agua destilada. Realizar movimientos suaves.
7. Sumergir el gel en **Carbonato de Sodio (30g/L) y Formaldehido 0.08%** en una **relación de 2:1**. Realizar movimientos suaves.
8. Documentar los perfiles tomando varias fotografías a medida que las bandas se intensifican.
9. Para preservar los geles se los coloca en medio de dos **(02) hojas de Papel celofán** previamente humedecido con agua y se coloca sobre un soporte de vidrio. Dejar secar a temperatura ambiente.

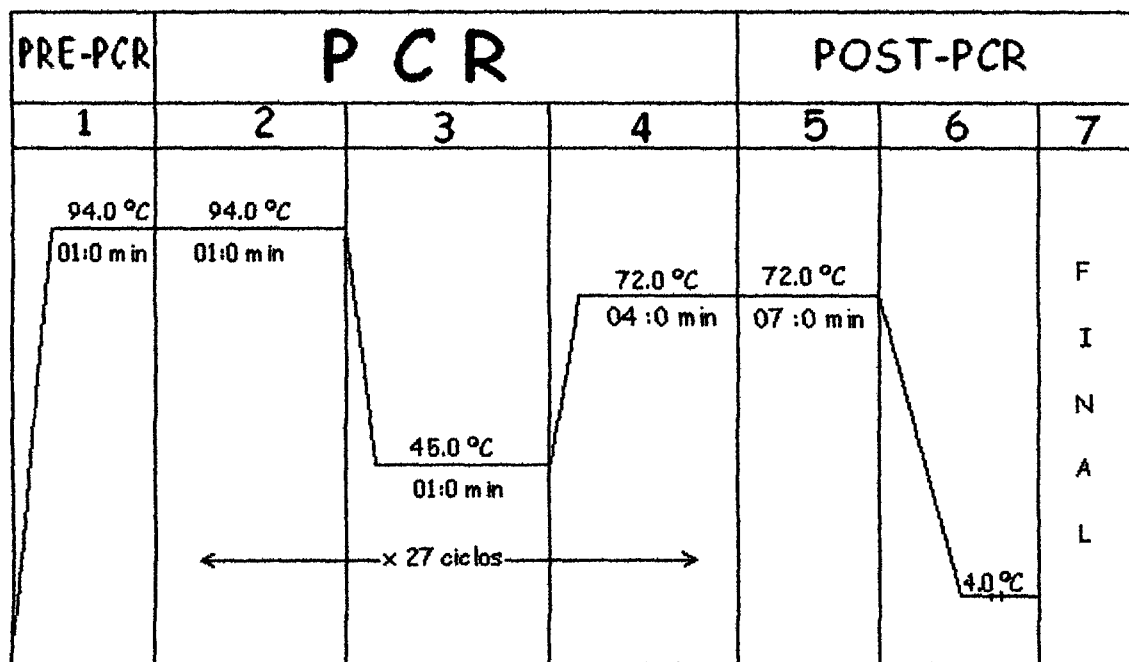


## ANEXO 05: CONDICIONES PARA LA AMPLIFICACION DE DNA DE

### *Plukenetia* vía ISSR-PCR

Condiciones para la amplificación con el primer CAA

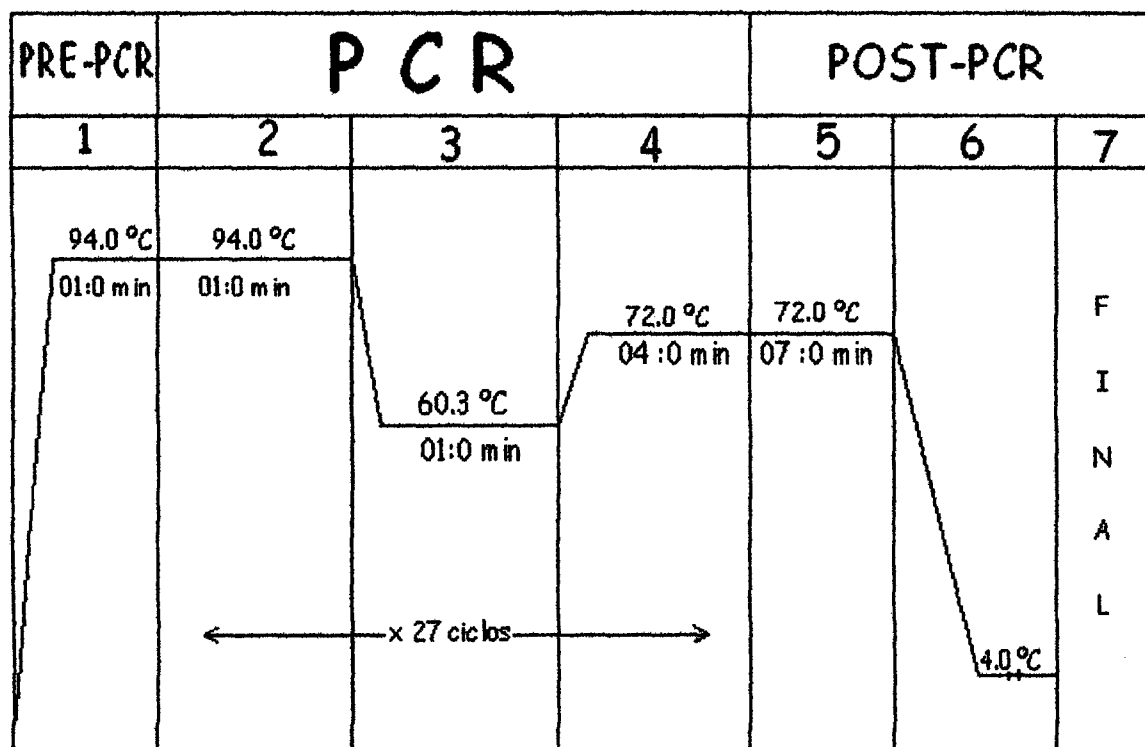
Premix			
Compuesto	Concentración inicial	Concentración final	Cantidad unitaria
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	5 mM	5.00
Buffer	10 X	2 X	5.00
CAA	10 µM	0.8 µM	2.00
dNTPmix	10 mM	0.3 mM	0.75
Taq	5 U/µl	0.08 U/µl	0.38
Total Premix	—————→		13.13
Agua	-	-	6.87
DNA	100 ng/µl	20 ng/µl	5.00
Total	—————→		25.0



Condiciones de Alineamiento para la PCR con CAA

Condiciones para la amplificación de DNA con el primer CAG

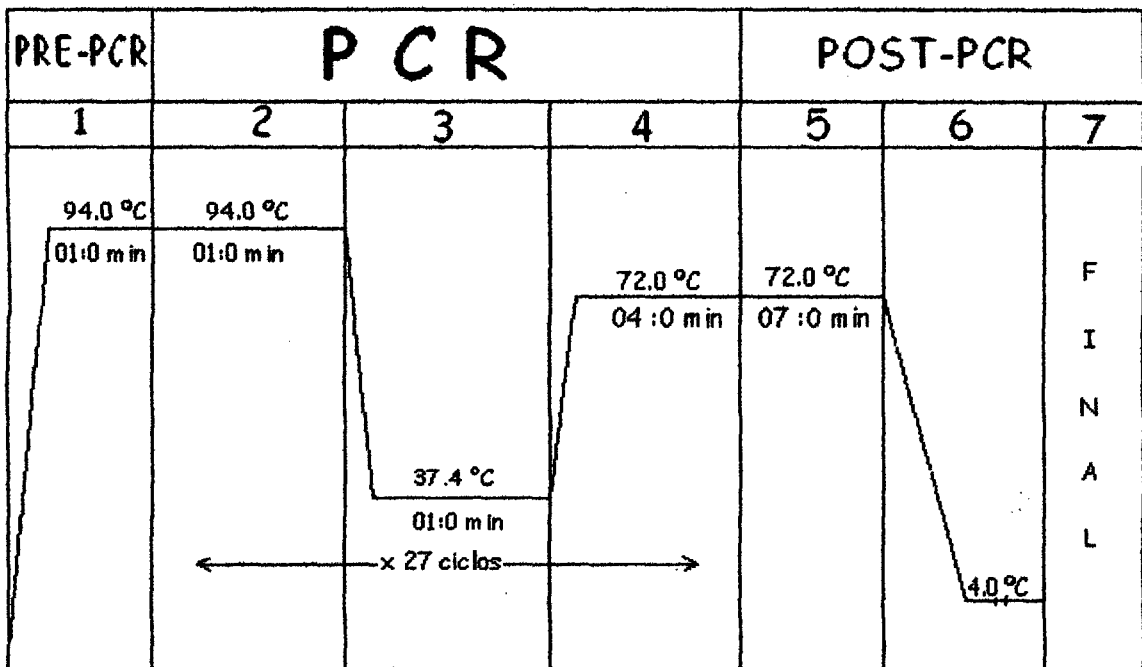
Premix			
Compuesto	Concentración inicial	Concentración final	Cantidad unitaria
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	5 mM	5.00
Buffer	10 X	2 X	5.00
CAG	10 μM	0.8 μM	2.00
dNTPmix	10 mM	0.1 mM	0.25
Taq	5 U/μl	0.08 U/μl	0.38
Total Premix	—————→		12.63
Agua	-	-	7.37
DNA	100 ng/μl	20 ng/μl	5.00
Total	—————→		25.0



Condiciones de Alineamiento para la PCR con CAG

Condiciones para la amplificación de DNA con el primer GACA

Premix			
Compuesto	Concentración inicial	Concentración final	Cantidad unitaria
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	5 mM	5.00
Buffer	10 X	2 X	5.00
GACA	10 µM	0.8 µM	2.00
dNTPmix	10 mM	0.3 mM	0.75
Taq	5 U/µl	0.08 U/µl	0.38
Total Premix	—————→		13.13
Agua	-	-	6.87
DNA	100 ng/µl	20 ng/µl	5.00
Total	—————→		25.0



Condiciones de Alineamiento para la PCR con GACA





UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA AMAZONIA PERUANA  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
HERBARIUM AMAZONENSE (AMAZ)  
Esquina Pevas/Nanay - Telefono 23 6121 - Apartado Postal 326  
E-mail: [herbarium@amaz.com.pe](mailto:herbarium@amaz.com.pe).  
Iquitos-Perú

*Centro de Estudio, Investigación y Enseñanza*

### CERTIFICADO

LA DIRECTORA DEL HERBARIUM AMAZONENSE DE LA  
UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA AMAZONIA PERUANA,  
CERTIFICA:

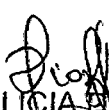
Que, las muestras botánicas colectados por el Br. **Angel Martín Rodríguez del Castillo**, pertenecen al proyecto de tesis titulado: "RELACIONES FILOGENÉTICAS DEL GENERO *Plukenetia* Linnaeus, 1753 (EUPHORBIACEAE) EN LA AMAZONIA PERUANA", los cuales fueron verificados e identificados en este Centro de Estudio, Investigación y Enseñanza, como a continuación se indica:

<u>Familia</u>	<u>Nombre Científico</u>	<u>Nombre Vulgar</u>
EUPHORBIACEAE	<i>Plukenetia brachybotrya</i> Mullg. Arg.	"sacha, sacha inchi"
EUPHORBIACEAE	<i>Plukenetia loretensis</i> Ule	"sacha, sacha inchi"
EUPHORBIACEAE	<i>Plukenetia polyadenia</i> Mull. Arg.	"sacha, sacha inchi"
EUPHORBIACEAE	<i>Plukenetia volúbilis</i> L.	"sacha inchi"
EUPHORBIACEAE	<i>Plukeneita</i> sp.	

Se expide el presente certificado, a solicitud del interesado para los fines que estime conveniente.

Iquitos, 24 de Febrero del 2009



  
Blga. FELICIA DIAZ JARAMA  
Directora (e) AMAZ

NO SALE  
DOMICILIO



339