

DIVERSIDAD GENÉTICA EN POBLACIONES NATURALES DE SACHA INCHI *Plukenetia volubilis* L. (EUPHORBIACEAE) EN EL DEPARTAMENTO DE SAN MARTÍN (PERÚ)

Mike CORAZON-GUIVIN¹, Ángel RODRÍGUEZ¹, Danter CACHIQUE², Werner CHOTA,² Guillermo VÁSQUEZ⁴, Dennis DEL-CASTILLO², Jean-François RENNO³, Carmen GARCÍA-DÁVILA²

- 1 Bocado de Pre-grado IIAP-INCAGRO. Iquitos, Perú. E-mail: mikecorazon10@gmail.com
- 2 Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana (IIAP). Apartado 784. Iquitos, Perú. E-mail: cdavila19@yahoo.com
- 3 Institut de Recherche pour le Développement (IRD). Montpellier, France.
- 4 Facultad de Ciencias Agrarias-Universidad Nacional de San Martín (UNSM) - Morales, San Martín.

RESUMEN

La diversidad genética poblacional de sachá inchi *Plukenetia volubilis* L. fue estimado mediante la técnica DALP (Amplificación Directa de Polimorfismo de Longitud), en cuatro localidades del departamento de San Martín. Para lo cual, un total de 83 muestras fueron colectadas en las localidades de Habana (21), Shica (20), Cerro Alto (21) y Tununtunumba (21). El estudio fue basado en el análisis de ocho marcadores DALP; de los cuales, tres (DALP221, DALP233 y DALP242) resultaron ser informativos para esta especie, mostrando diferencias a nivel intra e interpoblacional. Los resultados del Análisis Factorial de Correspondencia (AFC), Índice de fijación (promedio de $F_{st} = 0.83$) y distancia genética (promedio de $D = 2.56$) muestran que las cuatro poblaciones estudiadas forman entidades genéticas independientes. Esto, podría ser atribuido al sistema mixto de polinización (autógamo y alógamo) presente en esta especie, que estaría actuando preferentemente dentro de cada población y no entre las poblaciones. A nivel intrapoblacional, la población Shica presentó la mayor diversidad genética (15 genotipos) entre las cuatro poblaciones estudiadas, lo cual estaría relacionado con el mayor tamaño y densidad poblacional, que favorecería la polinización cruzada, trayendo como consecuencia una mayor diversidad genética. La alta divergencia (diferenciación) genética encontrada entre las cuatro poblaciones evaluadas, podría ser causada por la ausencia de insectos polinizadores directos, así como por la presencia de barreras naturales y por la distancia geográfica entre ellas, que estaría restringiendo el flujo de genes entre las poblaciones.

PALABRAS CLAVE: *Plukenetia volubilis*, sachá inchi, diversidad genética, poblaciones, DALP.

GENETIC VARIABILITY IN NATURAL POPULATIONS OF SACHA INCHI *Plukenetia volubilis* L. (EUPHORBIACEAE) IN THE REGIÓN SAN MARTÍN (PERU)

ABSTRACT

The population genetic variability in sachá inchi *Plukenetia volubilis* L. was analyzed in four localities of the San Martín region. A total of 83 samples collected in the localities of Habana (21), Shica (20), Cerro Alto (21) and Tununtunumba (21) was analyzed with the technique DALP "Direct Amplification of Length of Polymorphism". From eight DALP markers used, three turned out to be informative (DALP221, DALP233 y DALP242), showing differences at intra and inter-population level. The results of the AFC, index of fixation (average of $F_{st} = 0.82$) and genetic distance (average of $D = 2.56$) show that the four populations form independent genetic entities. This could be attributed to the mixed pollinization system (autogamy and allogamy) present in this species. That would be acting preferably only among the individuals of each population, but not among different populations. At intrapopulation level, the population of Shica has the greatest genetic diversity (15 genotypes) of the four studied populations, which would be related to the great size and population density. This would favor the crossing-pollinization, having as a consequence a greater genetic diversity. The high genetic diversity among the four populations of this species could be due to the absence of direct pollinizer insects as well as the presence of natural barriers and the geographic distance among them, which would be restricting the gene flow among the populations.

KEYWORDS: *Plukenetia volubilis*, sachá inchi, Genetic diversity, Population, DALP.

INTRODUCCIÓN

La Amazonía peruana, presenta una extensión de 756 866 km² y constituye la décima parte de todos los bosques del mundo (Kalliola, 1993). En el Perú, la Amazonía se divide en dos áreas geográficas naturales: selva baja y selva alta, según su ubicación altitudinal, la región de San Martín se encuentra ubicada entre estas dos áreas geográficas. Esta región, presenta dentro de su diversidad de recursos biológicos plantas silvestres como el “sacha inchi” *Plukenetia volubilis* L. (Valles, 1997), cuyas semillas presentan elevadas concentraciones de ácidos grasos esenciales tipo -3 y -6 (Hamaker *et al.*, 1992), que le confieren un potencial económico en el mercado nutracéutico, farmacéutico y alimenticio.

Actualmente, el sacha inchi viene siendo fuertemente cultivado (IIAP, 2009). Las semillas iniciales para la mayoría de estos cultivos provino de sus escasas poblaciones naturales, las cuales fueron sometidas a grandes presiones de colecta, muchas veces con métodos prohibitivos. La presión de colecta sumada a la creciente fragmentación de hábitats, podría estar causando una fuerte erosión genética en estas poblaciones. El estado de conservación genética de las poblaciones naturales, es esencial para establecer futuros planes de manejo y de mejoramiento genético de las especies (Rossiter *et al.*, 2000; Eirizik *et al.*, 2001; Ferreira & Gratapaglia, 1998). En este sentido, las técnicas moleculares son poderosas herramientas para el estudio de la diversidad genética de poblaciones naturales.

Los marcadores DALP (amplificación directa de polimorfismo de longitud) utilizados en este estudio son marcadores que no requieren de información previa sobre el genoma del organismo en estudio, pues usan primers universales, conocidos también como primers arbitrarios, los cuales se acoplan a regiones homólogas desconocidas del genoma produciendo patrones de bandas múltiples. Fueron inventados y utilizados por primera vez por Desmarais *et al.* (1998), para separar dos sub especies de ratones (*Mus musculus musculus* y *M. musculus domesticus*), reportando diferencias genéticas a nivel intraespecífico. Esta técnica también fue utilizada exitosamente para estudiar la variabilidad genética poblacional en especies vegetales medicinales como *Panax ginseng* y *Panax quinquefolius* (Ha *et al.*, 2001); y diez poblaciones naturales de *Stephania yunnanensis* (Yun-Shu *et al.*, 2008), obteniéndose resultados informativos a nivel intra e interpoblacional.

El presente estudio tuvo como objetivo analizar la variabilidad genética de cuatro poblaciones naturales de de sacha inchi *Plukenetia volubilis* L. de la región San Martín (Amazonía peruana), evaluados a través de la técnica DALP.

MATERIALES Y MÉTODOS

MUESTREO DE MATERIAL BIOLÓGICO

Fueron colectadas 83 muestras biológicas (tejido foliar) en cuatro poblaciones naturales de sacha inchi *Plukenetia volubilis* L. de la región de San Martín (Figura 1): Tununtunumba (UTM 9275914, 18M 0377811), Shica (UTM 9301077, 18M0315372), Cerro Alto (UTM 9281954, 18M 0357544) y Habana (UTM 9326684, 18M 0268917).

EXTRACCIÓN Y AMPLIFICACIÓN DE ADN

La extracción de ADN, fue realizada mediante el protocolo CTAB de Doyle & Doyle (1987), a partir de 100 mg de tejido foliar; y la amplificación del ADN, se realizó a través de la técnica DALP, utilizando ocho primers selectivos (Tabla 1), que en combinación con un primer reverso permitieron la amplificación de diversos fragmentos arbitrarios de ADN genómico. Produciendo cada combinación (marcador), un patrón específico de bandas múltiples; es decir, cada marcador amplificó una determinada región del genoma. La reacción de amplificación fue realizada en un volumen total de 25 ul, conteniendo 5 U/μl de Taq polimerasa, 100 ng/μl de ADN molde, 5X de Buffer, 10 mM dNTPs, 25 mM de MgCl₂, 10 μM de cada primer y agua ultrapura. Las condiciones de temperatura fueron: denaturación inicial a 95 °C x 1 min.; seguida de 29 ciclos de: denaturación a 91 °C x 30 seg., hibridación a 42.9 °C x 30 seg., y extensión a 72 °C x 30 seg.; seguida de una extensión final a 72 °C x 5 min. El patrón de bandas obtenido, fue verificado en geles de poliacrilamida al 6%, teñido con nitrato de plata mediante método Rabat (Sambrook & Russell, 1991).

ANÁLISIS DE DATOS

El polimorfismo entre las muestras fue analizado mediante la observación de presencia y ausencia de las bandas entre los individuos. A partir del cual se realizó una matriz binaria en base a la presencia (1) y ausencia (0) de las bandas diferenciales (polimórficas). El genotipo para cada uno de los individuos fue establecido a partir de la combinación de los perfiles

de bandas generadas por cada uno de los tres primeros DALP. La variabilidad genética a nivel intra e interpoblacional fueron establecidas mediante el Análisis Factorial de Correspondencia (AFC). La diferenciación entre las poblaciones fue estimada en base al índice de fijación (F_{st}) propuesto por Weir & Cockerham (1984); ambos análisis fueron realizados con la ayuda del software GENETIX versión 4.05 (Belkhir *et al.*, 2004). Las relaciones entre las

poblaciones fue establecida en base a un dendrograma (método UPGMA), elaborado a partir de la distancia genética (D) obtenida mediante la fórmula $D = -\ln(1 - F_{st})$ propuesta por Reynolds *et al.* (1983), así como los valores de Bootstrap (calculados en base a 1000 repeticiones) fueron obtenidos con la ayuda de los softwares PHYLIP versión 3.5 (Felsenstein, 1993) y TREVIEW (Page, 1996).

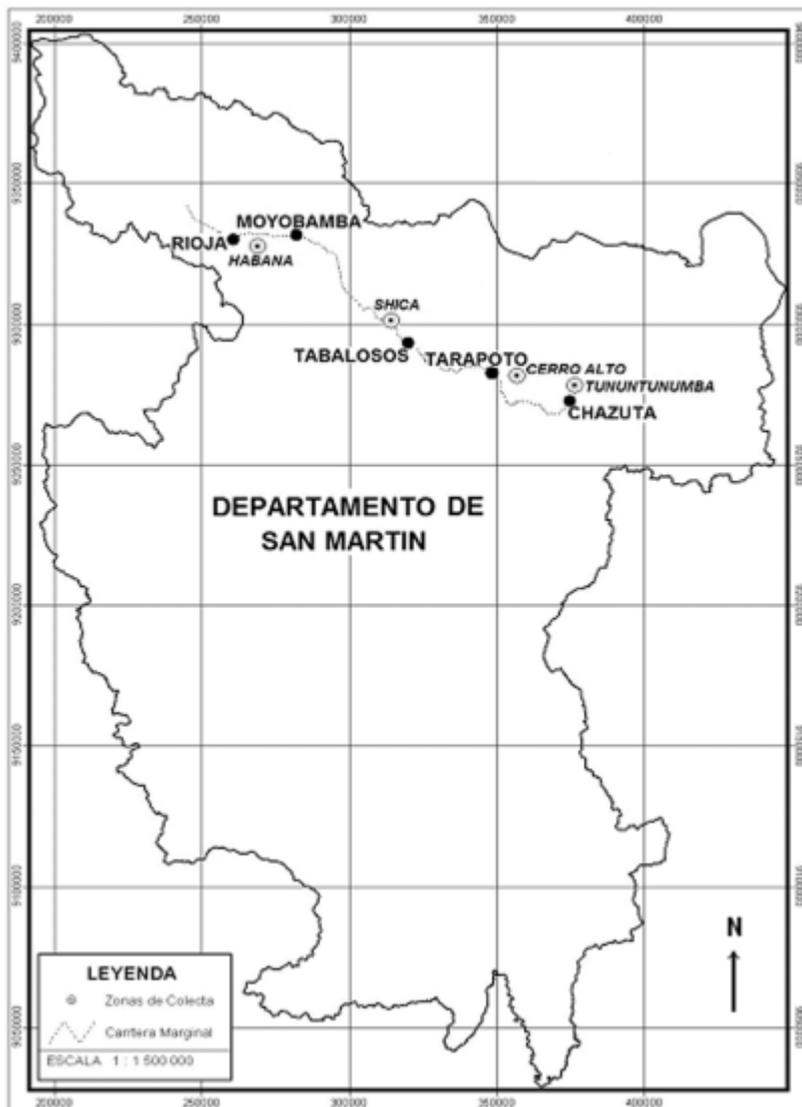


Figura 1. Mapa del departamento de San Martín indicando la localización geográfica de las cuatro poblaciones naturales de sacha inchi *Plukenetia volubilis*, evaluadas en el estudio.

Tabla 1. Marcadores DALP (Desmarais *et al.*, 1998) utilizados en el análisis de las poblaciones de sacha inchi (*Plukenetia volubilis*) de la región San Martín.

TIPO DE PRIMERS	PRIMERS	SECUENCIA
Primer reverso	DALP R	TTTCACACAGGAAACAGCTATGAC
Primers selectivos	DALP 221	GTTTTCCCAGTCACGAC GC
	DALP 231	GTTTTCCCAGTCACGAC AGC
	DALP 232	GTTTTCCCAGTCACGAC GAC
	DALP 233	GTTTTCCCAGTCACGAC ACG
	DALP 234	GTTTTCCCAGTCACGAC CAG
	DALP 235	GTTTTCCCAGTCACGAC CAC
	DALP 241	GTTTTCCCAGTCACGAC TCAG
	DALP 242	GTTTTCCCAGTCACGAC CTAG

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De los ocho marcadores DALP analizados, tres resultaron ser polimórficos (DALP221, DALP233 y DAL242), mostrando diferenciación a nivel intra e interpoblacional. El marcador DAL221 fue el más polimórfico, presentando nueve bandas informativas entre las poblaciones; dos de las cuales fueron diagnósticas para la población de Tununtunumba (bandas presentes únicamente en esta población), pudiendo diferenciarla genéticamente de las otras poblaciones. Así mismo, el marcador DALP233 mostró siete bandas informativas compartidas entre las diferentes poblaciones de sacha inchi estudiadas. Finalmente, el marcador DALP242 mostró cinco bandas informativas, de las cuales, solo una fue diagnóstica para la población de Shica (banda ausente únicamente en esta población).

DIVERSIDAD GENÉTICA POBLACIONAL

En la región San Martín, las poblaciones naturales de sacha inchi presentaron diferentes niveles de diversidad genética poblacional (Figura 2), encontrándose un total de 24 perfiles genéticos (genotipos). La mayor parte de los cuales fueron encontrados en la población Shica (15); en tanto, los nueve genotipos restantes se encuentran distribuidas entre las poblaciones de Cerro Alto (4), Habana (3) y Tununtunumba (2) que fueron menos diversas.

Los diferentes niveles de diversidad genética observada en cada una de las poblaciones, podrían estar influenciados por el sistema mixto de polinización (alógamo y autógamo) presente en esta

especie, por la capacidad de dispersión del polen y de las semillas, y por el tamaño y densidad poblacional. La población de Shica, que muestra la mayor diversidad genética, es la que presenta el mayor tamaño y densidad poblacional, por lo que suponemos que la acción del viento y otros factores abióticos tienen un mejor efecto en la polinización cruzada (alogamia) en esta población, aumentando el intercambio genético dentro de la población y eventualmente con las otras poblaciones vecinas, aumento así su diversidad genética. Esta hipótesis se ve sustentada por Raven *et al.* (1992), quien manifiesta que la polinización cruzada por acción del viento (anemofilia) no es muy eficaz entre individuos distantes, por no lograr abarcar grandes distancias; pero es eficiente si los individuos de una especie crecen unos junto a otros como es el caso de esta población. En el sacha inchi, los insectos no serían considerados como polinizadores directos; debido a que estos, visitan preferentemente solo a las flores masculinas más no las flores femeninas, por no considerarlas atractivas (Cachique, 2006).

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

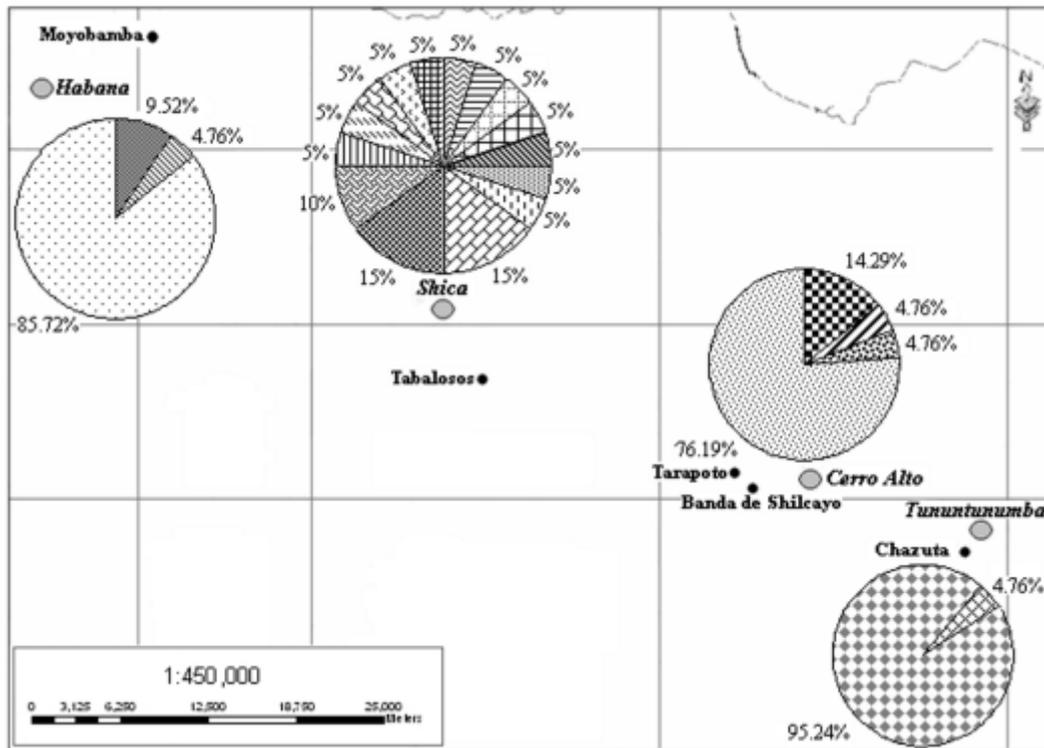


Figura 2. Genotipos obtenidos con los marcadores DALP 221, DALP 233 y DALP 242 en las cuatro poblaciones natural de sacha inchi *Plukenetia volubilis* de la región de San Martín.

VARIABILIDAD GENÉTICA INTERPOBLACIONAL

Los resultados del Análisis Factorial de Correspondencia (AFC) muestran una fuerte estructuración (diferenciación) entre las cuatro poblaciones naturales (Figura 3). Esto es corroborado por los niveles de diferenciación genética (promedio del índice de fijación: $F_{st} = 0.83$) encontrados entre la poblaciones de sacha inchi (Tabla 2). La literatura reporta que las poblaciones de plantas autógamias están fuertemente estructuradas en líneas puras, en comparación de las plantas alógamas que generalmente no presentan una estructuración definida (Loveless & Hamrick, 1984). La estructuración y altos niveles de diferenciación genética encontrados en el sacha inchi, podrían ser atribuidos a la restricción del flujo genético resultante de un conjunto de factores como: la presencia de barreras naturales entre las poblaciones, la distancia geográfica y el sistema mixto de polinización que actuaría preferentemente a nivel intrapoblacional. A esto se podría sumar que en décadas recientes, la deforestación y el daño de los bosques con la consecuente fragmentación de los mismos, podría

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

En *Croton alabamensis*, otra Euphorbiaceae que presenta un sistema mixto de polinización (Farmer, 1962) similar al sacha inchi, Van Ee *et al.* (2006), reportaron un F_{st} promedio de 0.28 entre poblaciones naturales, obtenido con la técnica AFLP (marcador con características muy similares al DALP, los autores usaron también una matriz binaria elaborada en base a la presencia y ausencia de bandas). Mientras que en el sacha inchi, nosotros reportamos un F_{st} promedio de 0.83 entre poblaciones naturales. Esta diferenciación del F_{st} entre las poblaciones de estas dos especies, podría ser explicada por la diferencia en los agentes polinizadores y sus preferencias. En el *Croton alabamensis*, la polinización es realizada

directamente por los insectos según observaciones hechas por Van Ee *et al.* (2006), quienes mencionan que estos visitan tanto a flores masculinas como a flores femeninas, lo que podría estar favoreciendo el flujo genético entre las poblaciones de esta especie, disminuyendo los niveles de F_{st} . En cambio, en el sacha inchi la polinización estaría más fuertemente influenciada por acción del viento, que tiene un área de

acción mas corta en el transporte de polen (actuando solo entre los individuos de una población, no pudiendo superar las distancias entre poblaciones lejanas), lo cual contribuiría al aislamiento genético entre las poblaciones por una disminución del flujo genético a consecuencia de la distancia geográfica y otros factores, trayendo como consecuencia un alto valor del F_{st} .

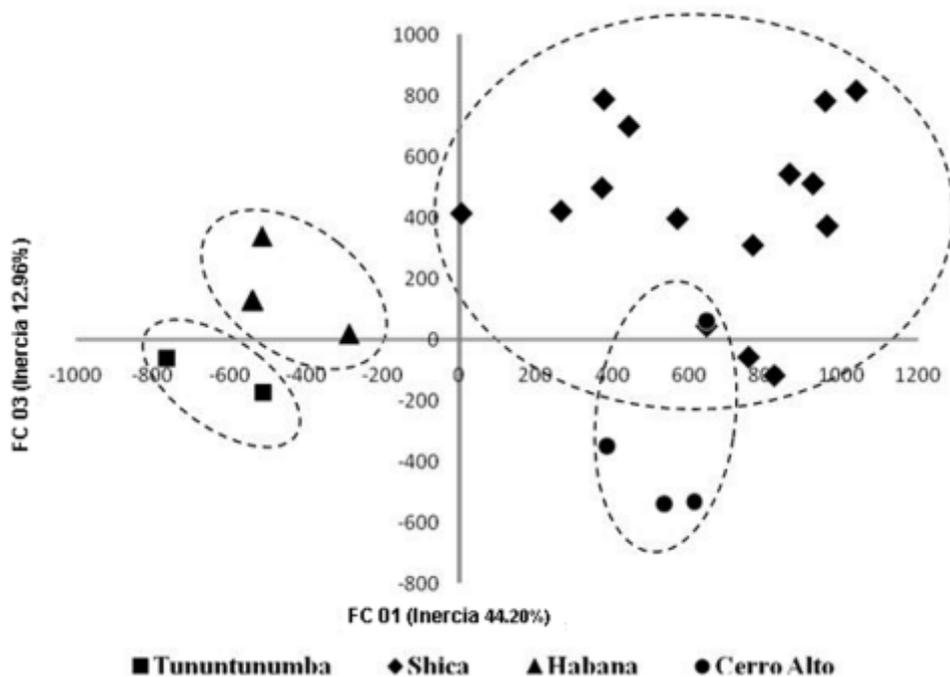


Figura 3. Representación gráfica de los resultados del Análisis Factorial de Correspondencia (AFC), inferidos en función a los genotipos encontrados para las cuatro poblaciones naturales de sacha inchi *Plukenetia volubilis* de la región de San Martín. Los puntos están distribuidos sobre un plano factorial bidimensional.

Tabla 2. Matriz del estimador F_{st} (parte superior tabla) y distancia genética (parte inferior tabla) para las cuatro poblaciones naturales de sacha inchi *Plukenetia volubilis* de la región de San Martín.

POBLACIONES	TUNUNTUNUMBA	SHICA	HABANA	CERRO ALTO
Tununtunumba	---	0.8260***	0.9487***	0.9506***
Shica	1.7486***	---	0.7955***	0.5429***
Habana	2.9706***	1.5873***	---	0.9275***
Cerro Alto	3.0082***	0.7829***	2.6235***	---

*** Altamente significativo a $P < 0.001$

RELACIONES FILOGEOGRÁFICAS ENTRE LAS CUATRO POBLACIONES

El dendrograma UPGMA (Figura 4), elaborado en base a la distancia genética de Reynolds *et al.* (1983), ver parte inferior de la Tabla 2, muestra la formación de dos grupos: el grupo A, conformado por tres poblaciones (Habana, Shica, Cerro Alto) divididas en dos sub grupos; y el grupo B, conformado únicamente por la población de Tununtunumba. Los resultados de correlación entre la distancia genética y la distancia geográfica entre estas poblaciones muestran que no existe una correlación entre estas dos variables ($r = 0.12$, $p = 0.5$). Esto es corroborado por el hecho de que las poblaciones de Tununtunumba y Cerro Alto que a pesar de ser las más cercanas geográficamente (21 Km) presentan la mayor distancia genética ($D = 3.0082$) entre ellas. Por lo que se presume, que la

Cordillera Escalera que separa en gran parte a la población de Tununtunumba (grupo B) de las demás poblaciones (grupo A), estaría actuando como una barrera geográfica natural (altitud = 1119 m.s.n.m). Esto estaría limitando un posible flujo genético de esta población con las demás poblaciones, aumentando los niveles de diferenciación genética entre ellas.

Los resultados obtenidos en el presente estudio, tanto a nivel de genética intra e interpoblacional nos permiten recomendar lo siguiente: i) conservar a la población de Shica como stock genético, debida a su mayor diversidad genética; ii) realizar futuros cruzamientos entre las poblaciones más distantes genéticamente, con la finalidad de obtener nuevas variantes genéticas aprovechables para el mejoramiento del sacha inchi.

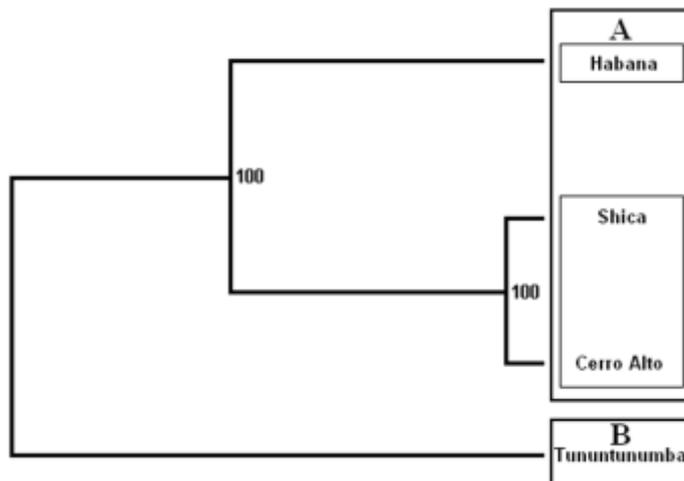


Figura 4. Dendrograma de similitud (UPGMA) generado con la distancia genética de Reynolds *et al.* (1983) para las cuatro poblaciones de sacha inchi *Plukenetia volubilis* de la región de San Martín. Los números en los nudos de las ramas representan valores de Bootstrap para 1000 repeticiones.

AGRADECIMIENTOS

Al Proyecto Innovación y Competitividad para el Agro Peruano – INCAGRO, por el financiamiento parcial del presente estudio a través del subproyecto “Obtención de líneas mejoradas de sachá inchi (*Plukenetia volubilis* L.), a partir de material genético con altos rendimientos y contenidos de omega 3 y omega 6”.

BIBLIOGRAFÍA CITADA

- 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.
- Cachique, D. 2006. Estudio de la Biología Floral y Reproductiva en el Cultivo de Sachá inchi (*Plukenetia volubilis* L.) INIEA-UNSM. Tesis para optar el Título de Ingeniero Agrónomo. Universidad Nacional de San Martín, Tarapoto, Perú. 70pp.
- Desmarais, E.; Laneluc, I.; Lagnel, J. 1998. Direct amplification of length polymorphisms (DALP) or how to get and characterize new genetic markers in many species. *Nucleic Acids Research*, 26(6):1458-65.
- Doyle, J.J.; Doyle J. L. 1987. A rapid ADN isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19:11-5.
- Farmer, J.A. 1962. An ecological life history of *Croton alabamensis* EA. Smith ex Chapman. Ph.D Thesis. University of Alabama, Alabama. 93pp.
- Felsenstein, J. 1993. PHYLIP. Phylogeny inference package, versión 3.05, general information manual. University of Washington, Seattle, Washington.
- Ferreira, M.E.; Gratapaglia, D. 1998. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3ª ed. Brasília: EMBRAPA – CENARGEN. 220pp.
- Ha, W.Y.; Yau, F.C.; But, P.P.; Wang, J.; Shaw, P.C. 2001. Direct amplification of length polymorphism analysis differentiates *Panax ginseng* from *P. quinquefolius*. *Planta medica*, 67(6):587-9.
- 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 Chemistry*, 9:461-3.
- Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana, 2009. Estudio de viabilidad económica de *Plukenetia volubilis* Linneo, sachá inchi, en el departamento de San Martín. In Avances económicos N° 3, Gonzales, L.A.; Ríos, T.S. (compiladores). 66pp.
- Kalliola, R. 1993. Amazonía Peruana, vegetación húmeda tropical en el llano subandino. Proyecto Amazonía, Universidad de Turku; Turku, Finlandia, 265 pp.
- Loveles, M.D.; Hamrick, J.L. 1984. Ecological determinants of genetic structure in plants populations. *Ecology Systems*, 15:69-95.
- 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, United Kingdom.
- Raven, E.; Evert, R.; Eichhorn, E. 1992. *Biología de plantas*. Editorial Reverté, S.A. Barcelona. 773pp.
- Reynolds, J.; Weir, B.S.; Cockerham, C.C. 1983. Estimation of the coancestry coefficient: basis for a short-term genetic distance. *Genetics*, 105:767-779.
- Rossiter, S.; Jones, G.; Ransome, R.; Barratt, E. 2000. Genetic variation and population structure in the endangered greater *Rhinolophus ferrumequinum*. *Molecular Ecology*, 9:1131-1135.
- Sambrook, J.; Russell, D. 1991. *Molecular Cloning: A laboratory Manual*, 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Valles, C. 1995. Sachá Inchi, Importante Oleaginosa Selvática. Ed. Pura Selva, p. 40-41.
- Van Ee, B. W. ; Jelinski, N. ; Berry, P. E. ; Hipp, A. L. 2006. Phylogeny and biogeography of *Croton alabamensis* (Euphorbiaceae), a rare shrub from Texas and Alabama, using DNA sequence and AFLP data. *Molecular Ecology*, 15: 2735–2751.
- Weir, B.S.; Cockerham, C.C. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. In: *Evolution*, 38:1358-1370.