



Esta obra está bajo una [Licencia Creative Commons Atribución- NoComercial-Compartirigual 2.5 Perú](http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.5/pe/).

Vea una copia de esta licencia en <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.5/pe/>



UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN MARTÍN-TARAPOTO

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

ESCUELA PROFESIONAL DE AGRONOMÍA



Caracterización filogenética de diferentes especies del género *Plukenetia*

Linnaeus, 1753 (Euphorbiaceae) en la Amazonía Peruana

Tesis para optar el título profesional de Ingeniero Agrónomo

AUTOR:

José Antonio Vértiz Arellano

ASESOR:

Ing. M.Sc. Gillermo Vásquez Ramírez

CO-ASESORA:

Dra. Carmén Rosa García Dávila

Tarapoto – Perú

2017

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN MARTÍN-TARAPOTO

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

ESCUELA PROFESIONAL DE AGRONOMÍA



**Caracterización filogenética de diferentes especies del género *Plukenetia*
Linnaeus, 1753 (Euphorbiaceae) en la Amazonía Peruana**

AUTOR:

José Antonio Vértiz Arellano

Sustentado y aprobado ante el honorable jurado el día 05 de mayo del 2017

.....
Ing. M.Sc. Segundo Darío Maldonado Vásquez
PRESIDENTE

.....
Ing. M.Sc. Elías Flores Torres
SECRETARIO

.....
Ing. María Emilia Ruíz Sánchez
VOCAL

.....
Ing. M.Sc. Guillermo Vásquez Ramírez
ASESOR

Declaratoria de Autenticidad

José Antonio Vértiz Arellano, egresado de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Escuela Profesional de AGRONOMÍA de la Universidad Nacional de San Martín – Tarapoto, con DNI N° 70748441, con la tesis titulada: **Caracterización filogenética de diferentes especies del género *Plukenetia* Linnaeus, 1753 (Euphorbiaceae) en la Amazonía Peruana**

Declaro bajo juramento que:

1. La tesis presentada es de mi autoría.
2. He respetado las normas internacionales de citas y referencias para las fuentes consultadas. Por tanto, la tesis no ha sido plagiada ni total ni parcialmente.
3. La tesis no ha sido auto plagiada; es decir, no ha sido publicada ni presentada anteriormente para obtener algún grado académico previo o título profesional.
4. Los datos presentados en los resultados son reales, no han sido falseados, ni duplicados, ni copiados y por tanto los resultados que se presenten en la tesis se constituirán en aportes a la realidad investigada.

De considerar que el trabajo cuenta con una falta grave, como el hecho de contar con datos fraudulentos, demostrar indicios y plagio (al no citar la información con sus autores), plagio (al presentar información de otros trabajos como propios), **falsificación** (al presentar la información e ideas de otras personas de forma falsa), entre otros, asumo las consecuencias y sanciones que de mi acción se deriven, sometiéndonos a la normatividad vigente de la Universidad Nacional de San Martín – Tarapoto.

Tarapoto, 5 de mayo del 2017


José Antonio Vértiz Arellano
DNI N° 70748441



Formato de autorización NO EXCLUSIVA para la publicación de trabajos de investigación, conducentes a optar grados académicos y títulos profesionales en el Repositorio Digital de Tesis

1. Datos del autor:

Apellidos y nombres:	VÉRTIZ ARELLANO JOSÉ ANTONIO		
Código de alumno :	081178	Teléfono:	929-979-713
Correo electrónico :	heraclitoleo91@gmail.com	DNI:	70448443

(En caso haya más autores, llenar un formulario por autor)

2. Datos Académicos

Facultad de:	CIENCIAS AGRARIAS
Escuela Profesional de:	AGRONOMÍA

3. Tipo de trabajo de investigación

Tesis	(x)	Trabajo de investigación	()
Trabajo de suficiencia profesional	()		

4. Datos del Trabajo de investigación

Título :	CARACTERIZACIÓN FILOGENÉTICA DE DIFERENTES ESPECIES DEL GÉNERO <i>Plukenetia</i> LAMARCA, 1753 (EUPHORBACEAE) EN LA AMAZONÍA PERUANA
Año de publicación:	2017

5. Tipo de Acceso al documento

Acceso público *	(x)	Embargo	()
Acceso restringido **	()		

Si el autor elige el tipo de acceso abierto o público, otorga a la Universidad Nacional de San Martín – Tarapoto, una licencia **No Exclusiva**, para publicar, conservar y sin modificar su contenido, pueda convertirla a cualquier formato de fichero, medio o soporte, siempre con fines de seguridad, preservación y difusión en el Repositorio de Tesis Digital. Respetando siempre los Derechos de Autor y Propiedad Intelectual de acuerdo y en el Marco de la Ley 822.

En caso que el autor elija la segunda opción, es necesario y obligatorio que indique el sustento correspondiente:

6. Originalidad del archivo digital.

Por el presente dejo constancia que el archivo digital que entrego a la Universidad Nacional de San Martín - Tarapoto, como parte del proceso conducente a obtener el título profesional o grado académico, es la versión final del trabajo de investigación sustentado y aprobado por el Jurado.

7. Otorgamiento de una licencia *CREATIVE COMMONS*

Para investigaciones que son de acceso abierto se les otorgó una licencia *Creative Commons*, con la finalidad de que cualquier usuario pueda acceder a la obra, bajo los términos que dicha licencia implica

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.5/pe/>

El autor, por medio de este documento, autoriza a la Universidad Nacional de San Martín - Tarapoto, publicar su trabajo de investigación en formato digital en el Repositorio Digital de Tesis, al cual se podrá acceder, preservar y difundir de forma libre y gratuita, de manera íntegra a todo el documento.

Según el inciso 12.2, del artículo 12° del Reglamento del Registro Nacional de Trabajos de Investigación para optar grados académicos y títulos profesionales - RENATI "Las universidades, instituciones y escuelas de educación superior tienen como obligación registrar todos los trabajos de investigación y proyectos, incluyendo los metadatos en sus repositorios institucionales precisando si son de acceso abierto o restringido, los cuales serán posteriormente recolectados por el Repositorio Digital RENATI, a través del Repositorio ALICIA".



Firma y huella del Autor

8. Para ser llenado en el Repositorio Digital de Ciencia, Tecnología e Innovación de Acceso Abierto de la UNSM - T.

Fecha de recepción del documento.

28 / 12 / 2020



UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN MARTÍN - T.
Repositorio Digital de Ciencia, Tecnología e
Innovación de Acceso Abierto - UNSM-T.


Ing. M. Sc. Alfredo Ramos Perea
Responsable

***Acceso abierto:** uso lícito que confiere un titular de derechos de propiedad intelectual a cualquier persona, para que pueda acceder de manera inmediata y gratuita a una obra, datos procesados o estadísticas de monitoreo, sin necesidad de registro, suscripción, ni pago, estando autorizada a leerla, descargarla, reproducirla, distribuirla, imprimirla, buscarla y enlazar textos completos (Reglamento de la Ley No 30035).

**** Acceso restringido:** el documento no se visualizará en el Repositorio.

Dedicatoria

*No sé cómo expresar el cariño y agradecimiento que siento a mi familia y en especial a mis padres **JOSÉ ABEL VÉRTIZ CARMONA** y **MERCY ARELLANO ACOSTA**, por su empeño en brindarme su apoyo incondicional para salir adelante, por los sacrificios realizados y ser ejemplos de superación y admiración, por creer en mí en cada momento para verme cumplir mis metas, no los defraudare.*

Este trabajo que me llevó realizarlo más de un año es para ustedes con mucho amor y cariño.

José Antonio Vértiz Arellano

Agradecimiento

- Al Instituto de Investigaciones de la Amazonia Peruana - IIAP y al Programa de investigación en Manejo Integral del Bosque y Servicios Ambientales (PROBOSQUES) y al Programa Nacional de Innovación para la Competitividad y Productividad (Innovate. Perú) por la beca de estudios concedida y el financiamiento para la realización de la presente investigación en el margen del proyecto: Identificación de nuevas especies del género *Plukenetia*, con potencial nutracéutico de la Amazonía peruana.
- A la Dra. Carmen Rosa García Dávila; Jefa del Laboratorio de Biología y Genética Molecular (IIAP), por la orientación de esta investigación, todos los conocimientos brindados, por la paciencia, empeño, dedicación y apoyo permanente en la realización de la tesis.
- Al Ing. M.Sc. Guillermo Vásquez Ramírez, por el asesoramiento en el presente trabajo de investigación.
- A Mg. Diana Castro Ruiz, por la amistad, el apoyo y las enseñanzas desde el inicio en la adquisición de destrezas en el laboratorio.
- Al Dr. Dennis del Castillo Torres, por la motivación e interés mostrado en esta investigación.
- Al Ing. Danter Cachique Huansi, por la oportunidad brindada para la realización de este trabajo.
- Al Blgo. Ángel Rodríguez quien colaboro instruyendo en la identificación, colecta y preservación de muestras.
- A la Blga. Elsa Rengifo, quien colaboró en la colecta de la parte morfológica de algunas especies y la amistad brindada.
- A mis amigos del laboratorio por los consejos brindados y la amistad mostrada; María Sanchez, Christian Nolorbe, Eduardo Mejía, Carlos Angulo, Guillain Stivals, Werner Chota, Lucero Pintado, Mayra Flores, David Aldana, Antonio Dávila, Rosa Da Silva, Jhon, Rossana Díaz, Hugo Panduro, Rodrigo Loyola, Aaron Pajuelo, Lucho Zafra. A todos ellos gracias, por formar una familia de trabajo, por compartir mi estancia en esta ciudad, haciéndola más agradable y placentera, no los olvidaré.

Índice general	Página
Dedicatoria	vi
Agradecimiento	vii
Lista de siglas, abreviaturas y símbolos	xii
Lista de símbolos	xiii
Resumen	xiv
Abstract	xv
Introducción	1
CAPÍTULO I. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICAS	3
1.1. Evolución.....	3
1.2. Especiación.....	3
1.3. Mutación.....	4
1.4. Sistemática.....	4
1.5. Filogenia.....	5
1.6. Métodos de reconstrucción filogenética.....	5
1.7. <i>Maximum Likelihood</i> o Máxima Verosimilitud.....	5
1.8. Marcadores moleculares.....	6
1.8.1. Secuenciamiento en plantas.....	6
1.8.2. Espaciador intergenético <i>trnH-psbA</i>	7
1.8.3. Espaciador de transcripción interna (ITS).....	7
1.9. Descripción taxonómica de la familia Euphorbiaceae.....	8
1.10. Género <i>Plukenetia</i>	8
1.10.1. Clasificación Sistemática del género <i>Plukenetia</i>	8
1.10.2. Descripción taxonómica.....	9
1.10.3. Descripción morfológica.....	9
1.10.4. Distribución.....	9
1.10.5. Ecología.....	10
1.10.6. Utilización, importancia nutricional y económica.....	10
CAPÍTULO II. MATERIAL Y MÉTODOS	12
2.1. Materiales.....	12
2.2. Metodología.....	14
2.2.1. Lugar de muestro.....	14
2.2.2. Colecta de material biológico.....	15

2.2.3. Ubicación del área de trabajo.....	15
2.2.4. Identificación botánica.....	16
2.2.5. Extracción de DNA usando el método CTAB.....	16
2.2.6. Verificación de la extracción.....	17
2.2.7. Primera amplificación de DNA (vía PCR).....	18
2.2.8. Electroforesis y visualización de los productos amplificados.....	19
2.2.9. Reacción de secuenciamiento.....	19
2.2.10. Purificación y secuenciamiento.....	19
2.2.11. Edición y Alineamiento de las secuencias.....	19
2.2.12. Análisis de polimorfismos del ADN y determinación de aplótipos.	20
2.2.13. Determinación de los modelos de evolución molecular y divergencia genética.....	20
2.2.14. Análisis filogenético.....	21
CAPÍTULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	22
3.1. Resultados.....	22
3.1.1. Descripción morfológica de las especies identificadas.....	22
1. <i>Plukenetia brachybotrya</i> (Muell. Arg., 1865).....	22
2. <i>Plukenetia loretensis</i> (Ule, 1980).....	24
3. <i>Plukenetia polyadenia</i> (Muell. Arg., 1874).....	26
4. <i>Plukenetia volubilis</i> (Linnaeus, 1753).....	28
5. <i>Plukenetia huayllabambana</i> (Bussmann et al., 2009).....	30
6. <i>Plukenetia carolis-vegae</i> (Bussmann et al., 2013).....	32
7. <i>Plukenetia</i> sp. (morfotipo Cuzco).....	34
3.1.2. Análisis genético.....	35
3.1.2.1. Análisis del polimorfismo de las secuencias de los genes ITS y trnH-psbA	35
3.1.3. Divergencia (distancia) genética.....	36
3.1.4. Relaciones filogenéticas.....	38
3.2. Discusión.....	41
CONCLUSIONES.....	44
RECOMENDACIONES.....	45
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	46
ANEXO.....	57

Índice de tablas

Contenido	Pág.
Tabla 1. Especies, localidad, coordenadas y colector de colecta del género <i>Plukenetia</i> , en la Amazonía peruana	15
Tabla 2. Secuencias de cebadores usados para la secuenciación del género <i>Plukenetia</i> L.	18
Tabla 3. Resultados de polimorfismo del ADN para secuencias nucleotídicas de los genes ITS y trnH-psbA de las especies estudiadas del género <i>Plukenetia</i>	35
Tabla 4. Parámetros genéticos para los marcadores moleculares ITS (nuclear) y <i>trnH-psbA</i> (mitocondrial) de las especies estudiadas del género <i>Plukenetia</i>	36
Tabla 5. Divergencia intraespecífica e interespecífica de las especies estudiadas del género <i>Plukenetia</i> obtenida con el gen nuclear ITS	37
Tabla 6. Divergencia (distancia) intraespecífica e interespecífica de las especies estudiadas del género <i>Plukenetia</i> obtenida con el gen nuclear <i>trnH-psbA</i>	37

Índice de figuras

Contenido	Pág.
Figura 1. Distribución del género <i>Plukenetia</i> en el mundo	10
Figura 2. Mapa del Perú mostrando los puntos de colecta y las especies del género <i>Plukenetia</i> Linneo, 1753	14
Figura 3. Distribución de <i>Plukenetia brachybotrya</i> (Muell. Arg., 1865)	22
Figura 4. Descripción morfológica. <i>Plukenetia brachybotrya</i>	23
Figura 5. Distribución de <i>Plukenetia lorentensis</i> (Ule, 1980)	24
Figura 6. Descripción morfológica de <i>Plukenetia lorentensis</i>	25
Figura 7. Distribución de <i>Plukenetia polyadenia</i> . (Muell. Arg., 1874)	26
Figura 8. Descripción morfológica de <i>Plukenetia polyadenia</i>	27
Figura 9. Distribución de <i>Plukenetia volubilis</i> (Linnaea., 1753)	28
Figura 10. Descripción morfológica de <i>Plukenetia volubilis</i>	29
Figura 11. Distribución de <i>Plukenetia huayllabambana</i> (Bussmann <i>et al.</i> , 2009)	30
Figura 12. Descripción morfológica de <i>Plukenetia huayllabambana</i> .	31
Figura 13. Distribución de <i>Plukenetia carolis-vegae</i> (Bussmann <i>et al.</i> , 2013)	32
Figura 14. Descripción morfológica de <i>Plukenetia carolis-vegae</i>	33
Figura 15. Distribución de <i>Plukenetia</i> sp. (morfortipo Cuzco)	34
Figura 16. Descripción morfológica de <i>Plukenetia</i> sp.	35
Figura 17. Árbol consenso de Máxima Verosimilitud del gen ITS	39
Figura 18. Árbol consenso de Máxima Verosimilitud del gen trnH-psbA	40

Lista de siglas, abreviaturas y símbolos

LISTA DE ABREVIATURAS

CTAB	: Bromuro de Cetil Trimetil Amonio
DNA	: Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	: Desoxirribonucleotidos trifosfatos
EDTA	: Ácido etilendiamino tetra acético
Eta	: Número total de mutaciones
<i>Et al</i>	: Y otros
H	: Número de Haplotipos
Hd	: Diversidad haplotípica
H₂O mili-Q	: Agua ultrapura (destilada, ultrafiltrada, autoclavada)
ITS	: Espaciador transcrito interno
K	: Media de las diferencias nucleotídicas entre pares de individuos
MgSO₄	: Sulfato de Magnésio
MV	: Máxima Verosimilitud
N	: Número de Secuencias
NaCl	: Cloruro de Sodio
NaOH	: Hidróxido de Sodio
PCR	: Polymerase Chain Reaction
pH	: Potencial de Hidrogeno
PsbA	: Gen que codifica la proteína D1 del fotosistema II del cloroplasto
rDNA	: DNA ribosomal
S	: Número de sitios polimórficos
Sp.	: Espécie
Taq	: <i>Thermus aquaticus</i>
tRNA	: Ácido ribonucleico transportador
trnH	: Gene de Trna
T92+G	: Tamura 3 parametros, más distribución gamma
TBE	: Tris Borato EDTA
Tris BASE	: Tris Hydroxymetyl aminomethano
Tris HCl	: Tris Hydroxymetyl aminomethano
Vis/UV	: Luz ultravioleta visible

Lista de símbolos

°C	: Grados Celcius
%	: Porcentaje
Π	: Diversidad nucleotídica
Hr	: Hora(s)
Gr	: Gramo(s)
μL	: Microlitro(s)
μM	: Micromolar
Mg	: Miligramo(s)
mM	: Milimolar
mL	: Mililitro(s)
Min	: Minuto(s)
Ng	: Nanogramo(s)
Pb	: Pares de bases
Rpm	: Revolución por minuto.
Seg	: Segundo(s)

Resumen

Este estudio tuvo como objetivo caracterizar morfológica y genéticamente las seis especies taxonómicas más un morfotipo del género *Plukenetia* reportadas para la Amazonía peruana: *P. volubilis*, *P. brachybotrya*, *P. lorentensis*, *P. polyadenia*, *P. huayllabambana*, *P. carolis-vegae* y *Plukenetia* sp. morfotipo Cusco. Para lo cual se colectaron muestras biológicas de entre cuatro a seis individuos por especie y morfotipo en las localidades de procedencia de las diferentes especies en la Amazonía peruana (regiones Amazonas, Cusco, Loreto y San Martín). Para la caracterización molecular fue realizado el secuenciamiento nucleotídico de dos regiones del genoma de estas especies (región nuclear ribosomal ITS y la región cloroplásica trnH-psbA). El análisis de divergencia genética y los árboles filogenéticos permitieron corroborar la identidad taxonómica de cinco de las seis especies taxonómicas (*P. volubilis*, *P. brachybotrya*, *P. lorentensis*, *P. polyadenia*, *P. huayllabambana*), además de determinar que las especies *P. huayllabambana* y *P. carolis-vegae* constituyen una sola entidad genética (Distancia genética = 0.000), es decir constituirían especies sinónimas. Al contrario *P. volubilis* y *P. volubilis* morfotipo Cusco presentan dos entidades genéticas diferentes (Distancia genética entre 0.010 y 0.033), es decir sería una nueva especie. Asimismo, las especies taxonómicas *P. volubilis*, *P. huayllabambana* y *P. carolis-vegae*, más el morfotipo Cusco *Plukenetia* sp estarían conformando un grupo monofilético (presentan un ancestro común).

Palabras clave: *Plukenetia*, secuenciamiento nucleotídico, ITS, trnH-psbA.

Abstract

This study aimed to characterize morphologically and genetically six taxonomic species plus one morphotype of the genus *Plukenetia* reported for the Peruvian Amazon: *P. volubilis*, *P. brachybotrya*, *P. loretensis*, *P. polyadenia*, *P. huayllabambana*, *P. carolis-vegae* and *Plukenetia* sp. morphotype Cuzco. For which biological samples were collected from four to six individuals per species and morphotype in the localities of origin of the different species in the Peruvian Amazon (Amazonas, Cusco, Loreto and San Martín regions). For the molecular characterization was performed the nucleotide sequencing of two regions of the genome of these species (nuclear ribosomal ITS region and the chloroplast trnH-psbA region). The analysis of genetic divergence and phylogenetic trees allowed to corroborate the taxonomic identity of five of the six taxonomic species (*P. volubilis*, *P. brachybotrya*, *P. loretensis*, *P. polyadenia*, *P. huayllabambana*), in addition to determining which species *P. huayllabambana* and *P. carolis-vegae* constitute a single genetic entity (genetic distance = 0.000), is they constitute synonymous species. Unlike *P. volubilis* and *P. volubilis* Cuzco morphotype present two different genetic entities (Genetic distance between 0.010 and 0.033), ie would be a new species. Also the taxonomic species *P. volubilis*, *P. huayllabambana* and *P. carolis-vegae* plus *Plukenetia* sp Cuzco morphotype. They would be forming a monophyletic group (they have a common ancestor).

Keywords: *Plukenetia*, nucleotide sequencing, ITS, trnH-psbA.



Introducción

La Amazonía peruana es una de las regiones biológicas más diversas del mundo, presenta diferentes ecosistemas y un elevado número de especies (Kalliola, 1993). Los pisos ecológicos diversos presentes en la región amazónica permitió, la domesticación de numerosas especies nativas de plantas con una gran variabilidad genética (Zapata, 2001), muchas de las cuales poseen gran potencial económico y constituyen un importante aporte en la región. En las últimas décadas la Amazonía ha sufrido una fuerte ocupación poblacional y territorial. Generando en algunas regiones, una gran pérdida de diversidad en la flora y fauna amazónica (muchas de las cuales todavía no estudiadas, es decir sin que se tenga una real visión de su potencial económico), debido a un continuo reemplazo de los bosques por una agricultura extensiva de especies domesticadas o en proceso de domesticación. Existe la necesidad de generar información base (biología, sistemática morfológica y molecular, etc.) sobre la biodiversidad para conocer la real amplitud de estos recursos, especialmente de aquellas que posean un potencial económico. El conocimiento de la identidad taxonómica de las especies, es un factor importante para la conservación y en los procesos de domesticación o mejoramiento de las especies de un determinado género.

Este es el caso de especies diversas como el sacha inchi, en la que hasta el momento no conocemos la real extensión de su biodiversidad. Hasta el 2009 los estudios existentes, abordaban la caracterización taxonómica solo en base a análisis morfológicos, los cuales no permitían diferenciar claramente las especies; debido a que los caracteres diagnósticos (caracteres diferenciales entre las especies) dificultaban una identificación taxonómica segura (Rodríguez *et al.*, 2010). En el año 2010 se realizó la primera revisión taxonómica molecular en base a tres primers (CAA (CAACAACAACAACA), CAG (CAGCAGCAGCAG) y GACA GACAGACAGACACA)), o cebadores universales (ISSR) diseñados por Bernet & Branchard (2001) (Rodríguez *et al.*, 2010). Los marcadores utilizados en este estudio no permitieron conclusiones definitivas a cerca de la extensión de la diversidad específica y las relaciones entre las especies en este género, por lo que fue necesario realizar nuevas evaluaciones en base a herramientas moleculares mucho más sólidas. Como las secuencias nucleotídicas que son utilizados no solo para la identificación de especies (códigos de barras), sino también para establecer y esclarecer

relaciones filogenéticas difíciles de abordar por otros métodos, así como también para cuestionar visiones basadas solo en evaluaciones morfológicas (Judd *et al.*, 1999; Borneo & Branchard, 2001; García-Dávila *et al.*, 2013).

En este sentido, para el presente estudio se utilizó las secuencias nucleotídicas del gen nuclear (ITS) y gen cloroplástico (*trnH* - *psbA*) para generar información sobre las relaciones filogenéticas entre las diferentes especies y morfotipos del género *Plukenetia* Linnaeus, 1753 (Euphorbiaceae) presentes en la Amazonía peruana. Pretendiendo de esta manera generar información que pueda contribuir al conocimiento y domesticación de este género en la Amazonía peruana.

Este trabajo de investigación tuvo como objetivo general: Caracterizar genéticamente las especies del género *Plukenetia* en la Amazonía peruana.

Y como objetivos específicos: Caracterizar morfológicamente seis especies y un morfotipo del género *Plukenetia* provenientes de poblaciones naturales de la Amazonía peruana y Establecer las relaciones filogenéticas entre seis especies y un morfotipo del género *Plukenetia* provenientes de poblaciones naturales de la Amazonía peruana.

El presente trabajo de investigación tuvo las siguientes estructuras:

Referencias bibliográficas, materiales y métodos y resultados y discusiones.

CAPÍTULO I

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICAS

1.1. Evolución

La evolución es el cambio hereditario de los organismos que se da a través del tiempo, el cual se forma con la interacción que existe entre el organismo y su ambiente, modificando (directa o indirectamente) los cambios que se darán de una generación a otra (Soler, 2002; Aguilar, 2002). En 1859 se aceptó formalmente la *teoría del origen de las especies* propuesta por Darwin, que explica los principios de la evolución como: (1) la “variación”, que es la que explica que los individuos pueden tener genes similares, pero diferir en las características fenotípicas y ambientales; (2) la “herencia”, que es la que permite que las variaciones puedan ser transmitidas de una generación a otra; y por último, (3) la “selección natural”, que es considerada como el principal motor de la evolución, porque permite que los caracteres favorables sean fijados de una generación a otra y los desfavorables sean eliminados por selección, de esta manera las diferencias biológicas heredables existentes entre los individuos conducen al cambio genético en poblaciones o especies (Endeler, 1986; Harrison, 2001; Reznik, 2001; Zamora, 2002). Esta teoría afirma también, que los cambios que se dan en los organismos, ocasionados por la selección natural, después de un prolongado periodo de tiempo producen organismos diferentes a su ancestro, es decir otra especie (Ayala *et al.*, 2000). Así mismo con la complementación de la “teoría mendeliana de la herencia”, dan lugar actualmente a la “teoría sintética de la evolución”, apoyado en los conocimientos de la genética y del tratamiento matemático de la dinámica de poblaciones (Fisher, 1930; Dozhansky, 1937; Soler, 2002; Aguilar, 2002).

1.2. Especiación

Para comprender la especiación, es necesario saber qué es una especie. El concepto de especie es básico en la biología, pero cada área como la genética, taxonomía, biogeografía, paleontología, etc., presentan su definición propia (Tinnaut & Ruano, 2002). La especie es una palabra del latín “*specie*”, que significa, conjunto de cosas a las que conviene una misma definición. Las especies son grupos de poblaciones naturales que potencialmente pueden entrecruzarse y que están reproductivamente

aislado de otros organismos (Mayr, 1942). Así mismo, la especie es el fundamento para crear las clasificaciones (Mishler & De Luna, 1997).

Entonces, la especiación se puede definir, como el proceso de formaciones de nuevas especies por la presencia de barreras (reproductivas, geográficas) las cuales se definen como aquellas características internas o externas de los organismos que impiden o minimizan el intercambio de genes entre organismos de poblaciones distintas (Cuevas, 2012), así mismo es la responsable de la diversidad biológica existente (Wood & Rieseberg, 2001). Para que se de este proceso, debe existir divergencia genética y aislamiento reproductivo entre especies antes relacionadas, ambos procesos se pueden dar por especiación alopátrica o por especiación simpátrica (Otte, 2001). Especiación alopátrica o geográfica, el cual consiste en la separación geográfica de una especie con su ancestro común, llegando a formar poblaciones geográficamente aisladas (Mayr, 1942; Mousseau & Olvido, 2001; Perfectti, 2002). Mientras que la especiación simpátrica o reproductiva, se refiere a la formación de nuevas especies en el mismo espacio geográfico. (Kondrashov & Kondrashov, 1999; Dieckmann & Doebeli, 1999; Perfectti, 2002; Cuevas, 2012).

1.3. Mutación

La mutación es el cambio, alteración o variación desde una simple base hasta todo el código genético del ADN que es heredable (Judd *et al.*, 1999), así mismo, es la fuente principal de la basta variabilidad genética existente (Judd *et al.*, 1999; García-Ruíz, 2003).

1.4. Sistemática

La sistemática es la rama de la biología que estudia (detecta, describe y explica) la diversidad biológica y su historia evolutiva existente (Judd *et al.*, 1999; García-Ruíz, 2003; Benitez *et al.*, 2006). A partir de mediados del siglo pasado se desarrolló aspectos teóricos y metodológicos relacionados con la clasificación (Mayr, 1942), desde ese entonces empezó a aportar en la obtención de información que son empleadas en otras disciplinas biológicas (genética, biología molecular, anatomía, etc.) con el fin de construir clasificaciones y proponer hipótesis generales sobre evolución de los organismos (Eldredge & Cracraft, 1980; García-Ruíz, 2003; Lanteri *et al.*, 2006).

1.5. Filogenia

El termino deriva del griego (“φύλον”, raza y “genia”, nacimiento, producción, generación). La filogenia es la historia evolutiva de distintos grupos de organismos (especies), que permite ver el grado de homología y se visualizan como árboles (dendograma o cladograma) u hipótesis evolutivas (De Luna *et al.*, 2005). La filogenia está basada en grupos históricos que resultan de la división de linajes a través del tiempo (grupo monofiléticos) en relación al proceso evolutivo (Frost & Kluge, 1994). Actualmente para la reconstrucción de la filogenia de los organismos se utilizan secuencias de ADN que se conoce como filogenia molecular, el cual pueden ser complementados con caracteres morfológicos (Carpenter & Wheeler, 1999; Aguilar, 2002).

1.6. Métodos de reconstrucción filogenética

La finalidad de la reconstrucción filogenética es estimar mediante un árbol filogenético el grado de similitud que existe entre los individuos en estudio, que refleja el proceso evolutivo donde los organismos biológicos son el resultado de la progenie con modificación que es heredado de su ancestro (Darwin, 1859; Peña, 2011). Para la reconstrucción filogenética existen métodos, los que se utilizan en distancia genética, siendo más conocidos el método *neighbor-joining* (NJ), mínima evolución (ME) y los basados en caracteres o sistemática filogenética, como los métodos de máxima parsimonia (MP), de máxima verosimilitud (MV) (en inglés, *maximum likelihood*) y de inferencia Bayesiana (IB) (Swofford *et al.*, 1996; Holder & Lewis, 2003).

1.7. *Maximum Likelihood* o Máxima Verosilitud

La utilización de máxima verosimilitud en filogenia fue introducida por Cavalli-Sforza y Edwards (1967), posteriormente fue desarrollada y popularizada por Felsenstein (1981). La MV es un método estadístico fiable que es basado en el modelo de evolución para calcular las probabilidades y consiste en hallar el árbol o árboles más verosímil (Yang, 1996; Peña, 2011; Felsenstein, 2004). A partir de la adopción de un cierto modelo de evolución (M) y de la observación de los caracteres de determinados taxones (D), la verosimilitud de un árbol (T) es la probabilidad (P) de las observaciones (caracteres), dado de dicho árbol y el modelo asumido, $P(D; T, M)$, y es considerado como función de los árboles (Felsentein, 1988).

1.8. Marcadores moleculares

Los marcadores moleculares son definidos como cualquier molécula orgánica o inorgánica (ADN, ARN o proteínas, de tamaño conocido) que caracterice a un organismo de interés (SIDTA, 1999; Azofeifa-Delgado, 2006). El marcador que es más utilizado es el ADN, porque no es afectado por el ambiente y no varía a pesar de la edad del organismo (Aguilar, 2002). Existen distintos tipos de marcadores que pueden ser dominantes o co-dominantes (Karp & Edwards, 1998; Vaco, 2011). Algunos ejemplos de ellos son: Polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP), Amplificación aleatoria del ADN polimórfico (RAPD), Polimorfismo en la longitud de los fragmentos amplificados (AFLP), ISSR (intersecuencias simples repetidas), Microsatélites o Secuencias simples repetidas (SSR), Amplificación aleatoria del polimorfismo de microsatélites (RAMPO) etc. (Rallo *et al.*, 2002; Vaco, 2011). Es preciso mencionar que se realiza mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), el cual es una herramienta muy útil e importante por la facilidad y rapidez para sintetizar y multiplicar los fragmentos de ADN en estudio (Valadez & Kalh, 2000; Azofeifa-Delgado, 2006).

1.8.1. Secuenciamiento en plantas

En la década de los 70's se publicaron dos métodos de secuenciamiento (enzimático y químico), siendo el primero el más utilizado. El cual consiste en la determinación del orden de las bases nitrogenadas de un fragmento específico del ADN, produciendo radicalmente un cambio en la forma de comprender la genética (Jiménez-Escrig *et al.*, 2012). Hoy por hoy este se ha mejorado, obteniendo secuencias por síntesis mediante la catalización del ADN polimerasa, utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR); permitiendo la multiplicación de fragmentos cortos y estandarizados de ADN de las secuencias en estudio (Bentley *et al.*, 2008; Peña-Castro *et al.*, 2013). Las secuencias nucleotídicas son consideradas como una fuente muy útil de caracteres para estudios filogenéticos en angiospermas (Baldwin *et al.*, 1995; Arjona, 2012). Ya que se encuentran altamente representadas en el genoma, se puede amplificar con cantidades pequeñas de DNA y las secuencias están altamente conservadas dentro de la mayoría de los genes del ADNn y ADNc (Liston *et al.*, 1996). Estas regiones han sido ampliamente usadas para el esclarecimiento de las relaciones entre taxa a niveles inter e intragenéricos o inter e intraespecíficas (Baldwin *et al.*, 1995; Liston *et al.*, 1996).

Diferentes marcadores moleculares son utilizados para los estudios filogenéticos en plantas, esto debido, a que un marcador puede ser informativo (capaz de establecer diferencia en base a la variabilidad molecular) para un grupo de plantas, en tanto, que el mismo marcador puede ser conservado para otro (no ser capaz de discriminar las especies dentro de un grupo).

Los marcadores moleculares informativos determinados para el estudio de la filogenia del género *Plukenetia* fueron *trnH-psbA* (RNA_t His - proteína D1 del fotosistema II) y ITS (Espaciador transcrito interno), los cuales también fueron informativos en el estudio de la filogenia de otros grupos de plantas.

1.8.2. Espaciador intergenético *trnH-psbA*

El genoma del cloroplasto es el más corto (promedio de 160Kb) con respecto a los demás genomas (DNA_nr y DNA_mt), es muy propicio la utilización como fuente de carácter para el rastreo de eventos de interés, tiene una alta tasa de sustitución y poca recombinación, es decir, que es muy variable tanto en el tipo como en la velocidad de mutación, siendo las regiones intergenéticas las más usadas (Cuéllar-Martínez, 2011; Vaco, 2011; Molineros, 2012). La región *trnH-psbA* es un espaciador ubicado entre los genes que codifican la proteína D1 del fotosistema II (PsbA) y el RNA_t His (GUG) (TrnH), así mismo tiene una alta tasa de mutación (indels), dentro del genoma (Sugiura, 1992; Shaw *et al.*, 2005; Vaco, 2011). Esta región está siendo utilizada en diversos estudios filogenéticos, debido al grado de discriminación de especies (69%) y el porcentaje de amplificación en plantas angiospermas (93%). A pesar de la baja calidad en las secuencias (Kress & Erickson, 2007; Ji *et al.*, 2008; Hollingsworth *et al.*, 2009; González *et al.*, 2009; Pang *et al.*, 2012, Cadavid, 2013; Santhosh-Kumar *et al.*, 2015).

1.8.3. Espaciador de transcripción interna (ITS)

El genoma nuclear es el más grande y puede tener millones de kb (Cuéllar-Martínez, 2011). La región de los espaciadores transcritos internos está en el ADN ribosomal nuclear (ADN_nr), es relativamente homogénea en el genoma, está formado por ITS2 + subunidad 5.8S + ITS2 y es muy variable dentro la región ITS, así mismo es una fuente muy útil en estudios filogenéticos para determinar y discriminar relaciones inter e intra específicas en angiospermas (Baldwin *et al.*,

1995; Aguilar, 2002; Kress *et al.*, 2005; Hollingsworth *et al.*, 2011; García-Aguilar, 2014). Sin embargo, presenta limitaciones como la difícil capacidad de amplificar y presenta una pequeña cantidad de nucleótidos (550 - 700 pb) (Baldwin *et al.*, 1995; González *et al.*, 2009).

1.9. Descripción taxonómica de la familia Euphorbiaceae

La familia Euphorbiaceae es uno de los grupos más diversos de dicotiledóneas en los trópicos (Webster, 1994), alberga gran diversidad y está representada en regiones tropicales y subtropicales, encontrándose desde plantas rastreras hasta árboles, así mismo desde plantas anuales a perennes, conociendo alrededor de 6500 especies en 245 géneros y se caracterizan principalmente por la presencia de una sustancia lechosa, tipo látex y frutos pueden ser esquizocarpos, bayas, drupas (Goaverts *et al.*, 2000). En el Perú esta familia está representada por 61 género y alrededor de 323 especies aproximadamente (León *et al.*, 2006).

1.10. Género *Plukenetia*

1.10.1. Clasificación sistemática del género *Plukenetia*

La clasificación de las especies peruanas de *Plukenetia* aquí presentadas fue realizada según, Gillespie (1993); Gillespie & Armbruster (1997), Mobot (2007), Bussmann *et al.* (2009), Rodríguez (2010) y Bussmann *et al.* (2013).

Reino	: Plantae
Subreino	: Fanerogama
Clase	: Magnoliopsida (Angiospermae)
Subclase	: Rosidae
Orden	: Euphorbiales
Familia	: Euphorbiaceae
Subfamilia	: Alcalyphoideae
Tribu	: Plukenetieae
Género	: <i>Plukenetia</i>
Especies	: <i>Plukenetia volubilis</i> (Linnaeus, 1753) <i>Plukenetia brachybotrya</i> (Muell. Arg., 1865) <i>Plukenetia lorentensis</i> (Ule, 1980)

Plukenetia polyadenia (Müller. Arg., 1874)

Plukenetia huayllabambana (Bussmann *et al.*, 2009).

Plukenetia carolis-vegae (Bussmann *et al.*, 2013).

Plukenetia sp (morfortipo Cusco)

1.10.2. Descripción taxonómica

El género *Plukenetia* L.u pertenece a la familia Euphorbiaceae. Es un género pantropical de lianas y sogas enredadas de 22 especies descritas taxonómicamente hasta el momento, perteneciendo a la tribu Plukenetieae de la subfamilia Acalyphoideae (Gillespie, 2007; Bussmann *et al.*, 2009; Bussmann *et al.*, 2013). Caracterizándose por presentar ovarios de cuatro carpelos, glándulas basilaminares, numerosos estambres y pistilos, con frecuencia largo, flores con cuatro sépalos (Gillespie, 2007; Bussmann *et al.*, 2013).

1.10.3. Descripción morfológica

Las plantas del género *Plukenetia* no presentan látex y se diferencian de otros géneros por ser lianas o bejucos trepadores, presentan hojas simples, alternas y pecioladas o aserradas, con pequeñas estipulas, presenta también glándulas basilaminares sobre la superficie de la hoja, inflorescencia racimosa, flores monoecia o unisexuales, estaminadas, pedicelada, de 4-5 sépalos valvados, sin corola, estambres libres de 15 a 40 y ovario de 4 lóculos, frutos en forma de bayas o capsula de cuatro lados (tetralobados o tetragonal) raramente 5 – 6 particiones y las semillas son subglobosas, ovoides y a menudo comprimidos lateralmente, carunculada, de diferentes tamaños y superficie lisa o rugosa. (Gillespie, 1993; Gillespie & Armbruster, 1997; Rodríguez, 2010).

1.10.4. Distribución

Plukenetia L. es un género que posee 22 especies, se distribuye en zonas tropicales y sub tropicales del mundo, es decir es un género pantropical (Figura 1), encontrándose 14 especies en América, siete entre África y Madagascar, y una especie en Asia. En el neotropico se han registrado diferentes especies de este género en todos los países de la cuenca amazónica incluyendo desde las Guayanas hasta México (Gillespie, 1993; Gillespie, 2007; Bussmann *et al.*, 2009; Bussmann *et al.*, 2013). Actualmente en Perú se reportaron en este género siete especies y

están distribuidas en toda la Amazonía peruana: *Plukenetia brachybotrya*, *P. carolis-vegae*, *P. huayllabambana*, *P. lorentensis*, *P. polyadenia*, *P. verrugosa*, *P. volubilis* y un morfotipo *Plukenetia* sp. Cusco que es una nueva especie; todas estas especies fueron reportadas en la amazonia peruana (Gillespie, 1993; Bussmann *et al.*, 2009; Rodríguez *et al.*, 2010; Bussmann *et al.*, 2013).



Figura 1. Distribución del género *Plukenetia* en el mundo.

1.10.5. Ecología

Como el género *Plukenetia* crece en diferentes zonas (pisos altitudinales o ecológicos) tropicales del mundo, desde bosques más bajos y húmedos hasta ceja de selva o pies de montañas andinas, encontrándose a partir de 70 m.s.n.m. hasta 2200 m.s.n.m... En el Perú las especies *Plukenetia brachybotrya*, *P. lorentensis*, *P. polyadenia*, *P. volubilis* y *P. verrucosa* fueron reportadas hasta los 900 m.s.n.m., mientras que *P. huayllabambana*, *P. carolis-vegae* y *Plukenetia* sp. morfotipo Cusco, por encima de los 1500 m.s.n.m. (Gillespie, 1993; Gillespie, 2007; Bussmann *et al.*, 2013).

1.10.6. Utilización, importancia nutricional y económica

Algunas de las especies de este género fueron conocidas y cultivadas en el Perú desde épocas pre incas e incas como es el caso de las especies *Plukenetia volubilis* y *P. huayllabambana*, conocidas como sacha inchi, maní del monte o maní del inca, maní peanuts, etc., siendo usadas para la alimentación y medicación (IIAP, 2009). Actualmente estas especies son consideradas como las mejores

oleaginosas, esto debido principalmente a las bondades que muestran, por lo que vienen siendo empleadas como alimentos, cosméticos, etc... Estudios realizados para *P. volubilis* en el año 1980 por Hazen & Stoewesand, mostraron la gran capacidad nutricional e importancia, el cual es rica en ácidos grasos esenciales (linolenico o omega 3 (48,60%), linoleico o omega 6 (36,80) y oleico o omega 9 (8,28%), de 54% aproximadamente) y no esenciales, proteínas (33%) y vitamina A y E (Corazon-Guivin, 2009; Rodríguez, 2010). Mientras para *P. huayllabambana* muestra su capacidad nutricional como, linolenico o omega 3 (61,29%); linoleico o omega 6 (25,11%); oleico o omega 9 (9%); también contiene vitamina A y E. (Bussmann *et al.*, 2013).

CAPÍTULO II

MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Materiales

2.1.1. Materiales de vidrio:

- Matraces.
- Probetas.
- Placas petri.
- Probetas graduadas de 100 ml.
- Vasos de precipitado.

2.1.2. Materiales de plástico:

- Guantes quirúrgicos.
- Gradillas para microtubos.
- Micropipetas de 2,5, 10, 20, 100, 200 y 1000 μ l.
- Microtubos de 0,2, 0,5, 1,5 y 2 ml.
- Tips de 10, 100, 200 y 1000 μ l.
- Sistemas de electroforesis vertical y horizontal.

2.1.3. Material biológico:

- Brotes de hojas tiernas (Primordios foliares), de siete especies del género *Plukenetia* Linnaeus 1753.
- Muestras botánicas (hojas, frutos y flores) de siete especies del género *Plukenetia* Linnaeus 1753.

2.1.4. Reactivos:

- Ácido bórico.
- Ácido nítrico.
- Agarosa.
- Azul Bromofenol.
- Bromuro de Etidio.
- Carbonato de sodio.
- Cloroformo.
- Cloruro de Sodio (NaCl)

- CTAB (Hexadecyltrimethylammoniumbromide).
- EDTA (Etylenodiaminetetraaceticacid).
- Etanol absoluto.
- Formaldehído.
- Hidróxido de Sodio.
- Isopropanol.
- Kit para PCR (Cloruro de Magnesio; desoxyribonucleosido trifosfatos (dNTP's); Taq DNA Polimerasa, *Thermus aquaticus*; Buffer).
- Nitrato de plata.
- Persulfato de amonio.
- Poliacrilamida.
- Primers (cebadores)
- Proteínasa K.
- Temed.
- TrisHCl (hydroxymethyl aminomethane).

2.1.5. Soluciones:

- Alcohol al 96 y 70%

2.1.6. Equipos:

- Autoclave Digital (Yamato – SE 310).
- Balanza analítica 220g (SARTORIUS).
- Baño Maria (JSB).
- Cámara de Electroforesis Horizontal pequeña. MINI – SUB (Bio – Rad).
- Cámara de Electroforesis vertical (Fisher Biotech).
- Centrifuga Refrigerada (Eppendorf – 5804R).
- Destilador de Agua (BARNSTEAD).
- Espectrofotómetro (Modelo Genesys 10uv).
- Foto documentadora de geles (GEL LOGIC 100 Imagensisten kodak).
- Horno Microondas (LG).
- Mini Vortexer (Fisher Scientific).
- Sistema de Purificación de Agua (MilliPore).
- Termociclador (Eppendorf – Master Cycler).
- TissueLyser II (Quiagen).

2.2. Metodología

2.2.1. Lugar de muestreo

Se colectó el material biológico de seis especies taxonómicas más un morfotipo del género *Plukenetia* en la Amazonía peruana (Figura 2). Las colectas fueron realizadas en base al banco de datos de Mobot (Jardín Botánico de Missouri, 2007); las claves dicotómicas reportadas por Gillespie & Armbruster (1997), Gillespie (1993), Busmann *et al.* (2009 y 2013). En la región Loreto fueron colectadas: *P. polyadenia*, *P. loretensis* y *P. brachybotrya*; en la región Amazonas: *P. huayllabambana* y *P. carolis-vega*; en la región San Martín: *Plukenetia volubilis* y en la región Cusco fue colectado un morfotipo que en este estudio es denominado *P. sp Cusco* (Tabla 1).

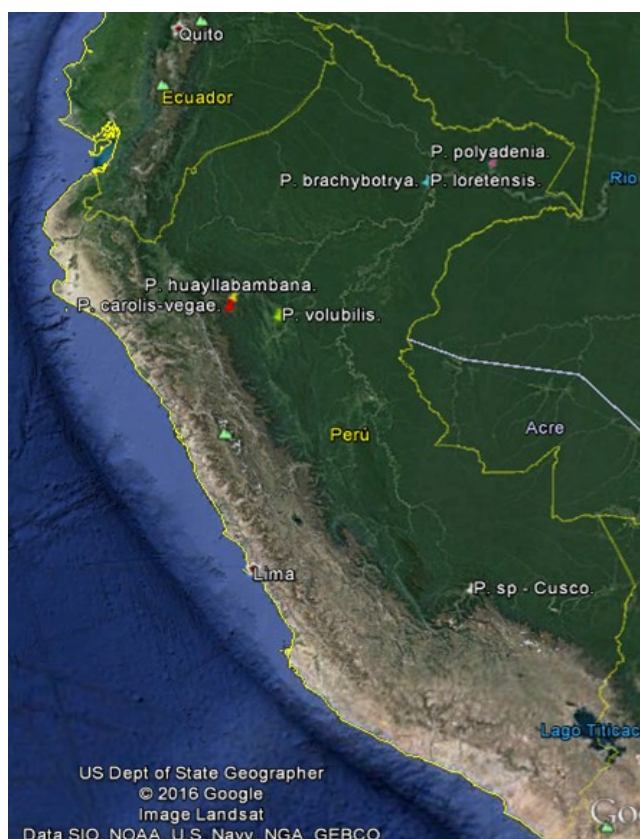


Figura 2. Mapa del Perú mostrando los puntos de colecta y las especies del género *Plukenetia* Linneo, 1753.

Tabla 1.

Especies, localidad y coordenadas y colectores de la colecta del género

Especie	Localidad/Provincia/Región	Latitud	Longitud	Altura	Colector
<i>P. brachybotrya</i>	Puero Almendra, Maynas, Loreto	03° 49' 39,8"	73° 22' 30,2"	101,0	José Vértiz
<i>P. carolis-vegae</i>	Monte Alegre, Rodríguez de Mendoza, Amazonas	06° 34' 53,4"	77° 32' 32,8"	1859,2	José Vértiz y Elsa Rengifo
<i>P. huayllabambana</i>	San Nicolás, Rodríguez de Mendoza, Amazonas	06° 23' 25,5"	77° 28' 0,8"	1687,9	José Vértiz y Elsa Rengifo
<i>P. lorentensis</i>	Puerto Almendra, Maynas, Loreto	03° 49' 38,8"	73° 22' 30,6"	110,0	José Vértiz y María Sanchez
<i>P. polyadenia</i>	Pevas, Ramón Castilla, Loreto	03° 19' 56,3"	71° 55' 58,4"	111,5	Ángel Rodríguez y Elsa Rengifo
<i>P. sp.</i>	Echarate, La Convención, Cusco	12° 42' 34,9"	72° 27' 30,9"	1780,1	José Vértiz y Ángel Rodríguez
<i>P. volubilis</i>	02 de Mayo, Bellavista, San Martín	06° 47' 34,4"	76° 32' 05,8"	286,9	José Vértiz

Fuente: *Elaboración propia (2015 y 2016)*

2.2.2. Colecta de material biológico

Se recolecto material de las especies del género *Plukenetia* mediante muestreo al azar, para que exista certeza de que un individuo sea diferente del otro se determino una distancia de 10 a 15 metros. Los primordios foliares colectados fueron conservados en tubos de 50 ml (tapa rosca) perfectamente identificados, conteniendo Sílica gel, cada muestra fue acondicionada con papel secante. Además, fueron colectadas muestras botánicas (hojas, flores, frutos) para la identificación taxonómica y se depositó de muestra testimonio (Muestra Voucher) en el Herbarium Herrerensis del IIAP.

2.2.3. Ubicación del área de trabajo

El trabajo de investigación fue realizado de manera descriptiva y se ejecutó en el Laboratorio Biología y Genética Molecular (LBGM) del “Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana” (IIAP), en la Estación Experimental Fernando Alcántara, ubicada en la carretera Iquitos-Nauta km 4.5, distrito de San Juan Bautista, región Loreto – Perú.

2.2.4. Identificación botánica

La identificación botánica de los grupos estudiados fue realizada mediante la clave propuesta por Gillespie (1993) para las especies neotropicales del género *Plukenetia* (Anexo 1). Según estas claves y en base a los caracteres morfológicos se pudieron identificar seis especies taxonómicas dentro del grupo *Plukenetia* estudiado: *P. lorentensis*, *P. brachybotrya*, *P. polyadenia*, *P. volubilis*, *P. huayllabambana* y *P. carolis-vegae*. Los caracteres morfológicos de las muestras provenientes de Cusco no se ajustan a los caracteres morfológicos de las especies antes mencionadas, por lo que fueron consideradas como un morfotipo, e identificado en este estudio como de *Plukenetia* sp. (Cusco).

La descripción de las especies fue realizada en base a las descripciones oficiales de la especie; Gillespie (1993) para las especies *P. volubilis*, *P. brachybotrya*, *P. polyadenia* y *P. lorentensis*; Bussmann *et al.* (2009) para *P. huayllabambana* y Bussmann *et al.* (2013) para *P. carolis-vegae*. Para el morfotipo *Plukenetia* sp. (Cusco) se utilizó la descripción preliminar realizada por Rodríguez (2010).

Por cada una de las seis especies fue elaborada una exsicata, sólo no fue elaborado del morfotipo proveniente de Cusco, debido a la pérdida del material biológico. Las exsicatas fueron fotodocumentada con el padrón de coloración oficial utilizado en los depósitos digitales de los herbarios a nivel mundial. Las exsicatas fueron depositadas como muestra testimonio de este estudio en el herbario Herrerensis del IIAP (uno de los depositarios oficiales de material biológico en el Perú).

2.2.5. Extracción de DNA usando el método CTAB

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

- Pesar 100mg de muestra, liofilizar en el TissueLyser II, colocar 1ml de la solución buffer tampón CTAB (CTAB 2%, NaCl 1M, EDTA 0,1M pH 8, Tris Base 0,2M) y agregar 10 µL de proteínasa K y macerar la muestra a 60 °C por 24 horas.

- Luego adicionar 1 ml de cloroformo, mezclar suavemente por 5 min, centrifugar a 8000 rpm/5 min, tomar 500 μ L de sobrenadante, colocar en un microtubo de 1,5 ml.
- Precipitar con de isopropanol frío por 2 horas a -20°C , luego centrifugar a 13000 rpm / 15 min desechar el sobrenadante, lavar el ADN con de etanol al 70% y centrifugar a 13000 rpm / 15 minutos (repetir este paso).
- Secar el precipitado en el concentrador (centrífuga al vacío) por 15 minutos y finalmente diluir el precipitado en 30 μ L de agua ultrapura.

2.2.6. Verificación de la extracción

A. Cuantificación por espectrofotometría del ADN

Para la evaluación de la pureza y concentración aproximada del ADN se usó el método espectrofotométrico de Maniatis *et al.* (1989), que mide las longitudes de ondas de 260 nm y 280 nm. Se utilizó un Biophotometro de la marca Merck, este equipo determina la pureza del ADN extraído por división de las longitudes de ondas de 260 nm y 280 nm., considerándose como ADN puro los que presentaban rangos entre: 1,7 – 2,0.

La concentración de las muestras es establecida automáticamente por el equipo en base a la capacidad de absorbancia de la longitud de onda de 260 nm, mediante la siguiente fórmula.

$$A_{260} \times F.D. \times 50 \text{ ng}/\mu\text{L}$$

Dónde: A = Absorbancia
 FD = Factor de dilución (1:100)

B. Verificación de la calidad del ADN extraído por electroforesis

Para constatar cual es el grado de fragmentación que presenta el ADN extraído, fue realizado una verificación de la integridad de la banda, Para lo cual 3 μ L del ADN fue mezclado con 3 μ L del buffer de siembra (Gel red) y sembrado en un gel de agarosa al 0,8%. La migración de ADN se realizó en una cámara electroforética horizontal (Marca Bio Rad, modelo Mini Sub Cell GT) conteniendo buffer de

corrida (TBE 1X), las condiciones de la corrida electroforética fueron: 100 Voltios (V) por 45 minutos, la visualización de los geles y el registro de los mismos fue realizado en un fotodocumentador de luz UV, en un sistema de imagen KODAK, modelo GEL LOGIC 100.

2.2.7. Primera amplificación de DNA (vía PCR)

Fue amplificado vía PCR la región cloroplástica no codificante del espaciador intergenético *trnH-psbA* y la región nuclear ITS (Internal Transcriberd Spacer), que es un ADN no codificante que flanquea la región que codifica la subunidad 5.8S del ARN estructural de los ribosomas. Las secuencias de los cebadores utilizados son presentadas (Tabla 2).

Tabla 2.

Secuencias de cebadores usados para la secuenciación del género Plukenetia L.

Región	Pb	Cebador	Secuencia (5' 3')	Autor
<i>trnH-psbA</i>	300–1000	trnH	CGC GCA TGG TGG ATT CAC AAT CC	Shaw <i>et al.</i> , 2005
		psbA	GTT ATG CAT GAA CGT AAT GCT C	
ITS	565 – 700	17SE	ACG AAT TCA TGG TCC GGT GAA GTG TTC G	Sun <i>et al.</i> , 1994
		26SE	TAG AAT TCC CCG GTT CGC TCG CCG TTA C	

Las amplificaciones se realizaron en un volumen final de 20 µl. Para ITS se utilizó 2,5 µl de 100 ng/µl de ADN; 2,0µl de 10x PCR buffer; 2,6 µl de 25 mM MgSO₄; 8,0 µl de 2 mM de dNTPs; 0,8µl de 10 µM de cada cebador; 1,2 µl de 1U/µl Taq polimerasa (Hot start) y se completó con agua ultrapura. Las condiciones de temperatura fueron: una desnaturalización inicial a 95°C x 2min, seguida de 30 ciclos consistentes en: desnaturalización (95°C x 1 min), hibridación (59,8°C x 1 min), elongación (72°C x 2min) Seguida de una extensión final a 72°C x 5 min. Para *trnH - psbA* se utilizó 2,5µl de 100 ng/µl de ADN; 2,0µl de 10x PCR buffer; 2,4 µl de 25 mM MgSO₄; 4,0 µl de 2 mM de dNTPs; 1,6 µl de 10 µM de cada cebador; 1,2 µl de 1U/µl Taq polimerasa (Hot start) y se completó con agua ultrapura. Las condiciones de temperatura fueron: una desnaturalización inicial a 95°C x 4 min, seguida de 35 ciclos consistentes en: desnaturalización (94°C x 30 seg), hibridación (de acuerdo a cada especie x 1 min), elongación (72°C x 1 min) Seguida de una extensión final a 72°C x 10 min.

2.2.8. Electroforesis y visualización de los productos amplificados

Los productos amplificados fueron verificados en corridas electroforéticas, utilizando gel de agarosa al 2 %, las condiciones de la corrida electroforética fueron: 100 Voltios (V) por 30 min, visualizando la migración del ADN en un transluminador de luz UV y fotodocumentado en un sistema de imagen KODAK, modelo GEL LOGIC 100.

2.2.9. Reacción de secuenciamiento

El PCR de secuenciamiento fue realizado con el kit comercial de secuenciamiento *ABI PRISM Big Dye Terminators v3.1 Cycle Sequencing* el cual utiliza el método enzimático de incorporación de desoxinucleótidos marcados con fluorocromos. El volumen final de la reacción fue de 10 µl, conteniendo 5,0 µl del producto de PCR; 3,0 µl de Big dye; 0,8 µl de uno de los primers y 1,2 µl de agua MiliQ. Las condiciones de temperatura fueron: una desnaturalización inicial a 96°C x 1min, seguida de 30 ciclos consistentes en: desnaturalización (96°C x 15 s), hibridación (50°C x 15 s), elongación (60°C x 4 min) Seguida de una extensión final a 72°C x 10 min.

2.2.10. Purificación y secuenciamiento

La purificación de los productos de secuenciamiento (eliminación de los productos no incorporados durante la PCR), fue realizada por precipitación y limpieza con alcohol. Este proceso consiste en precipitación con isopropanol 65%, dejar a temperatura ambiente por 20 min, luego centrifugar a 14000 rpm por 25 min, remover el isopropanol por inversión. Posteriormente lavar el ADN para eliminar los productos no incorporados por adición de 200 µl de etanol 60% y centrifugación por 5 min a 14000 rpm. Finalmente, secar en baño seco por 15 min a 45°C. La composición de bases nucleotídicas fueron determinadas en un Analizador Genético 3130XL (AppliedBiosystems), siguiendo las indicaciones del fabricante. Los productos fueron secuenciados en ambos sentidos de la cadena (Forward y Reverse). Las secuencias fueron analizadas mediante el software Sequencing Analysis v5.3.1.

2.2.11. Edición y Alineamiento de las secuencias

Para cada espécimen analizado fue generado una secuencia consenso, a partir de las secuencias brutas (Forward y Reverse) que fueron alineadas y editadas con ayuda

del programa BioEdit v.7.0,9 (Hall, 1999). La veracidad de la composición de bases nucleóticas fue realizada por comparación de la versión fasta con el cromatograma de las secuencias analizadas.

Para cada región analizada fue generada una matriz única (que reunía todas las secuencias consensos de los especímenes analizados) con ayuda del software de alineamiento múltiple ClustalW de Thompson *et al.* (1994) contenido en el software BioEdit v.7.0,9. La matriz general de cada región fueron alineadas mediante la inserción de espacios o “gaps”, con la finalidad de mantener la homología entre algunas de las bases nucleotídicas de los especímenes estudiados. Las diferencias en la longitud de los extremos de las secuencias consenso, fueron cortadas para obtener secuencias de la misma longitud; así, la planilla general para el ITS quedó conformada por 668 pares de bases, en tanto que la de *trnH - psbA* por 350 pares de bases. La región ITS fue utilizada para evaluar las seis especies de *Plukenetia* descritas para el Perú más el morfotipo proveniente de Cusco, en tanto que la región *trnH - psbA* pudo ser utilizada solo en cinco especies más el morfotipo cuzco, la especie *P. polyadenia* no pudo ser amplificada por incompatibilidad con el cebador.

2.2.12. Análisis de polimorfismos del ADN y determinación de haplotipos

Para cada región con ayuda del software DnaSP v.5,00 (Librado & Rozas, 2009) fue determinado los siguientes parámetros genéticos: número de Haplotipos (H), diversidad haplotípica (Hd), diversidad nucleotídica (π), número total de mutaciones (Eta), media de las diferencias nucleotídicas entre pares de individuos (K), número total de sitios, número de sitios polimórficos (S) y número de indels (Nei, 1987).

2.2.13. Determinación de los modelos de evolución molecular y divergencia genética

Antes del análisis de los datos fue necesario determinar el modelo de evolución nucleotídica para cada región analizada, los cuales fueron seleccionados de entre 24 modelos alternativos de acuerdo con los valores del (AIC) Criterio de Información Akaike (Akaike, 1973) basado en el Análisis de Filogenia y Evolución (APE), usando el software MEGA 6 (Nei & Kumar, 2000; Tamura *et al.*, 2013). Tanto para el gen ITS como para la región *trnH-psbA* el mejor modelo de

evolución fue Tamura 3 parámetro + gamma (T92 + G). Este modelo fue utilizado para estimar las divergencias genéticas par a par dentro y entre las especies.

2.2.14. Análisis filogenético

Para establecer las relaciones filogenéticas entre las especies de *Plukenetia* fueron construidos un árbol filogenético consenso para cada una de las regiones analizadas (ITS y *trnH-psbA*). Los cuales se basaron en el modelo de evolución previamente determinado (T92 + G), los arboles fueron construidos bajo el criterio de Máxima Verosimilitud MV (Felsenstein, 1981), cuyo principio es evaluar la probabilidad de un determinado modelo de cambio evolutivo para secuencias nucleotídicas y explicar el origen de los datos observados, y así permitir seleccionar a partir de una matriz, la topología que sea más verosímil. El nivel de confianza fue testado mediante el método no paramétrico bootstrap (Felsenstein, 1985), con 1000 réplicas; este análisis permite el remuestreo de caracteres de la matriz con reposición de datos, generando así nuevas matrices. Los arboles fueron construidos utilizando el Software MEGA 6 (Nei & Kumar, 2000; Tamura *et al.*, 2013).

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Resultados

3.1.1. Descripción morfológica de las especies identificadas

A continuación, se presenta una breve descripción taxonómica de las especies estudiadas:

1. *Plukenetia brachybotrya* (Muell. Arg., 1865)

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

Sinónimo: *Apodandra brachybotrya* (Muell Arg.), J.F. MacBr., Field Mus. Nat. Hist.Bot. Ser. 13(3a): 117. 1951.

Distribución. Se encuentra en la región oeste de la Amazonía brasilera (Acre, posiblemente Amazonas, Mato Grosso y Pará); Ecuador; Perú (Loreto) y Bolivia (Figura 3). Habita en tierras bajas y bosque húmedo montano bajo, con frecuencia en zonas perturbadas, hasta 900 msnm



Figura 3. Distribución de *Plukenetia brachybotrya* (Muell. Arg., 1865).

Descripción. Es una liana retorcida poco conocida que puede distinguirse de otras especies estrechamente relacionadas y similares vegetativamente, por presentar columnas estilares globosos (típicamente de 2-3 mm en diámetro). Cápsula con tubérculo redondeado en cada carpelo del lóbulo, y anteras que son en números de (24) 30-50 típicamente, glándulas basilaminares. Diámetro de la cápsula aproximado 1.15 cm. Semilla redondeada, lisa (Figura 4).



Figura 4. **A.** Exsicata de *Plukenetia brachybotrya*, **B.** Hábita de *Plukenetia brachybotrya*; **C.** Hoja mostrando glándulas basilaminares de *Plukenetia brachybotrya*; **D.** Forma de la hoja de *Plukenetia brachybotrya*; **E.** Frutos de *Plukenetia brachybotrya*.

2. *Plukenetia loretensis* (Ule, 1980)

Plukenetia loretensis Ule, Vert. Bot. Vereins. Prov. Brandenburg 81. 1980.
Sinonimo: *Apodandra loretensis* (Ule) Pax & K. Hoffm., Pflanzenr. IV.147. IX (Heft 68): 21, 1919. [Tipo: Perú. Loreto. Iquitos, Ule 6837 (isotipo, G!)].

Distribución. Se encuentra en la parte media y alta de la cuenca amazónica en Perú, Bolivia y Brasil [Amazonas, Mato Grosso, y Rondonia], y meridional de Venezuela y sudeste de la Guayana (Figura 5).



Figura 5. Distribución de *Plukenetia loretensis* (Ule, 1980).

Descripción. Es una liana delgada que habita bosques bajos, de húmedo a lluvioso, a 700 msnm. Es la única entre las especies Neotropicales en tener estiletes completamente fusionados, columna estilar cilíndrica, y una distinción de ovario de cuatro-cornudo y capsula madura, número de anteras 15 – 25 y glándulas basilaminares frecuentemente en pares múltiples en una sola cara de la nervadura (Figura 6).



Figura 6. A. Exsicata de *Plukenetia loretensis*, B. Hábita de *Plukenetia loretensis*; C. Flores de *Plukenetia loretensis*; D. Hoja mostrando glándulas basilaminares *Plukenetia loretensis*; E. Fruto de *Plukenetia loretensis*.

3. *Plukenetia polyadenia* (Muell. Arg., 1874)

Plukenetia polyadenia Muell. Arg. in Mart., Fl. bras., 11(2):334, 1874. Sinonimo: *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. *Plukenetia abutifolia* (Ducke) Pax & K. Hoffm., Nat. Pflanzenfam., ed. 2, 19c: 141, 1931.

Distribución. Difundido en las Guayanas y Venezuela oriental, y en la cuenca amazónica de Ecuador, norte de Perú (Loreto), y Brasil: Amapá, Amazonas, Para. Habita en bosques bajos, de húmedo a lluvioso, hasta 1000 msnm (Figura 7).

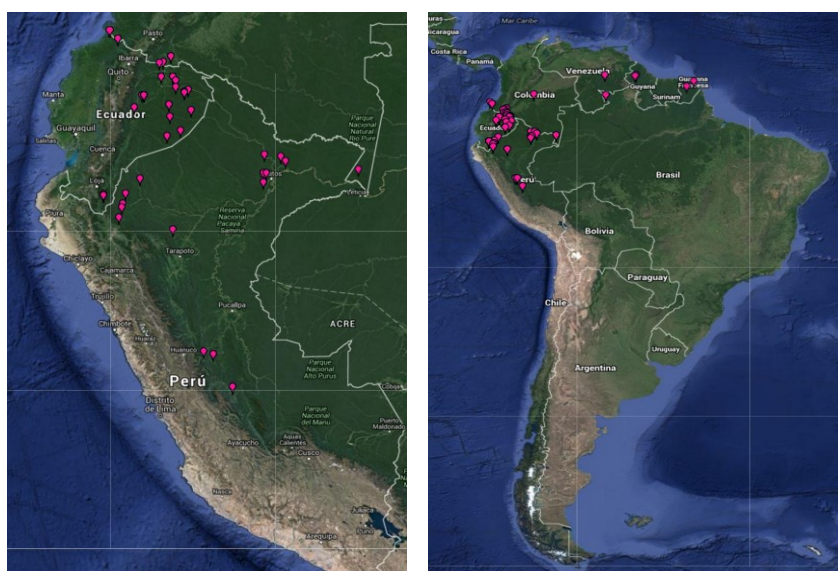


Figura 7. Distribución de *Plukenetia polyadenia* (Muell. Arg., 1874).

Descripción. Liana del dosel (Figura 8). Tallos 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, carnoso, indehiscente, con una amplia protuberancia cónica apical. Semillas ovoides, base redondeada, marrón opaco, superficie áspera (Figura 8).



Figura 8. **A.** Exsicata de *Plukenetia polyadenia*, **B.** Hábita de *Plukenetia polyadenia*; **C.** Hoja mostrando glándulas basilaminares de *Plukenetia polyadenia*; **D.** Flores de *Plukenetia polyadenia*; **E.** Fruto de *Plukenetia polyadenia*.

4. *Plukenetia volubilis* (Linnaeus, 1753)

Plukenetia volubilis L., Sp. pl., 1192, 1753. [Tipo: India occidental. Ilustración t. 13 (mitad inferior) en Plumier, Nov. Pl. Amer., 47, 1703].

Sinonimias: *Plukenetia peruviana* Muell. Arg., Linnaea, 34: 157, 1865. *Plukenetia macrostyla* Ule, Verh. Bot. Vereins Prov. Brandenburg 50: 80, 1908. *Fragaropsis paxii* Pittier, J. Wash. Acad. Sci. 19: 351. 1929.

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 (San Martín), Bolivia y Brasil: oeste de Amazonas, habita en bosques altos o bosques bajos húmedos, a 900 msnm. (Figura 9).

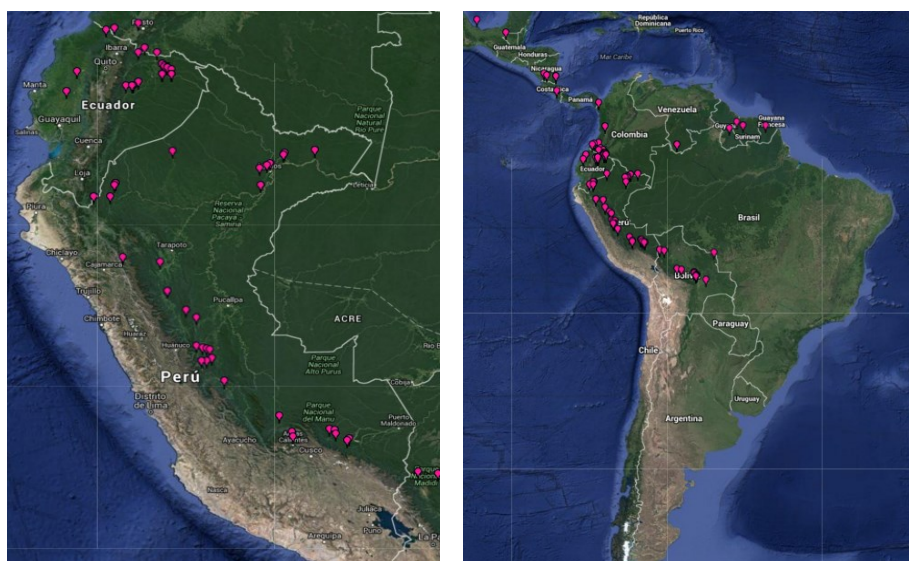


Figura 9. Distribución de *Plukenetia volubilis* (Linnaea., 1753).

Descripción. Liana delgada y retorcida, 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 (Figura 10).

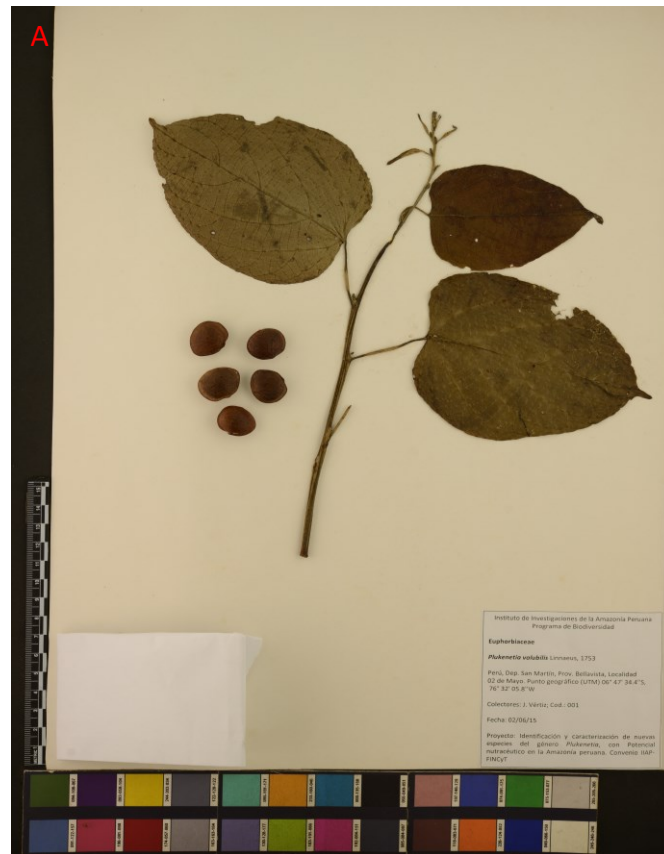


Figura 10. **A.** Exsicata de *Plukenetia volubilis*; **B.** Hábita de *Plukenetia volubilis*; **C.** Hoja mostrando glándulas basilaminares de *Plukenetia volubilis*; **D.** Hojas y flores *Plukenetia volubilis*; **E.** Fruto de *Plukenetia volubilis*.

5. *Plukenetia huayllabambana* (Bussmann *et al.*, 2009)

Distribución: La serie tipo proviene del Perú, región Amazonas, provincia de Rodríguez de Mendoza, Distrito de Chirimoto, a 1659 m.s.n.m (Figura 11). Habita en zonas pendientes rocosas del bosque nuboso cerca de la localidad El Cedro_Cruzpata a 1676 m.s.n.m.



Figura 11. Distribución de *Plukenetia huayllabambana* (Bussmann *et al.*, 2009).

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. Fruto con 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 (Figura12).



Figura 12. A. Exsicata de *Plukenetia huayllabambana*, B. Hábita de *Plukenetia huayllabambana*; C. Hoja mostrando glándulas basilaminares *Plukenetia huayllabambana*; D. Inflorescencia de *Plukenetia huayllabambana*; E. Fruto de *Plukenetia huayllabambana*.

6. *Plukenetia carolis-vegae* (Bussmann *et al.*, 2013)

Distribución. Perú, Región Amazonas, Provincia de Rodríguez de Mendoza, Distrito Limabamba, finca del Sr. Rodriguez en Monte Alegre. 1,854m, Se encuentra en las laderas orientales de los andes del norte del Perú, entre 1800 - 2200 m.s.n.m. Habita en zonas pendientes rocosas de bosque nuboso en las laderas orientales de los andes del norte del Perú, región Amazonas. (Figura 13).



Figura 13. Distribución de *Plukenetia carolis-vegae* (Bussmann *et al.*, 2013).

Descripción. *Plukenetia carolis-vegae* muestra características similares a *Plukenetia huayllabambana* (Bussmann *et al.*, 2009), pero difiere por tener flores masculinas con un número más pequeño de sépalos 4 en vez de 5, una protuberancia glandular, estiletes mucho más cortos 4-7 mm en lugar de 10-12 mm, filamentos mucho más amplios, hojas de mayor tamaño 7-12 x 9-17 cm vs. 4-10 - 7-14 cm y cordadas en vez de elípticas a ovado elípticas y frutos de mayor tamaño 4-8 - 5-10 cm en lugar de 3-4 - 4-6 cm (Figura 14).

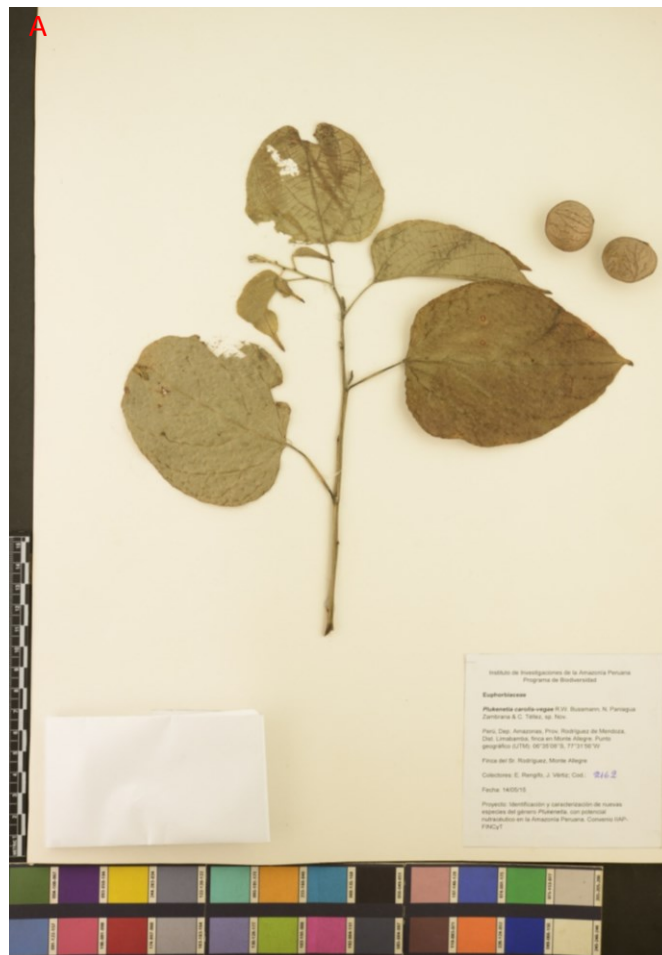


Figura 14. **A.** Exsicata de *Plukenetia carolis-vegae*; **B.** Hábita de *Plukenetia carolis-vegae*; **C.** Hoja mostrando glándulas basilaminares *Plukenetia carolis-vegae*; **D.** Inflorescencia de *Plukenetia carolis-vegae*; **E.** Fruto de *Plukenetia carolis-vegae*.

7. *Plukenetia* sp. (morfortipo Cuzco)

Distribución. Selva alta, Región Cuzco, Provincia de La Convención, Distrito de Echarati, a 1706 m.s.n.m, habita en zonas pendientes rocosas (Figura 15).



Figura 15. Distribución de *Plukenetia* sp (morfortipo Cuzco)

Descripción. Liana delgada, 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 16).



Figura 16. A. Hábita de *Plukenetia* sp.; B. Hoja mostrando glándulas basilaminares *Plukenetia* sp.; C. Inflorescencia de *Plukenetia* sp.; D. Fruto de *Plukenetia* sp.

3.1.2. Análisis genético

3.1.2.1. Análisis del polimorfismo de las secuencias de los genes ITS y trnH-psbA

Cuando analizadas las secuencias nucleotídicas de *Plukenetia*, se observó que las secuencias de ITS fueron menos conservados (76,8% = 513 sitios conservados de un total de 668 analizados) que las de trnH-psbA (81,4% = 285 sitios conservados de un total de 350 analizados). Las secuencias de ITS presentaron 117 sitios variables y las de trnH-psbA presentaron 55, de los cuales eran sitios informativos de parsimonia 108 en ITS y 50 en trnH-psbA (Tabla 3). Las bases nucleotídicas fueron conservadas (no presentaron mutaciones o cambios de bases) dentro de las especies y ni en el morfotipo.

Tabla 3.

Resultados de polimorfismo del ADN para secuencias nucleotídicas de los genes ITS y trnH-psbA de las especies estudiadas del género Plukenetia.

Sitios	ITS (Gen nuclear)	trnH-psbA (Gen cloroplástico)
Sitios informativos		
parsimonia	108	50
Sitios variables	117	55
Sitios conservados	513	285

Los parámetros genéticos de ITS y trnH-psbA para todas las especies (Tabla 4), mostraron que el gen ITS presentó una mayor diversidad nucleotídica (Hd) que trnH-psbA. También se registraron un total de 126 mutaciones en los 668 sitios analizados del gen ITS, mientras que un total 60 mutaciones fueron encontradas en las 350 bp de las secuencias del gen trnH-psbA analizadas. Solo en el valor de la diversidad nucleotídica (π) el gen trnH-psbA fue mayor ($\pi = 0,083$) que en ITS (0,063), los haplotipos observados en las secuencias corresponde al número de grupos analizados (6 para ITS y 5 para trnH-psbA), no observándose haplotipos dentro de las especies (Tabla 4).

Tabla 4.

Parámetros genéticos para los marcadores moleculares ITS (nuclear) y trnH-psbA (mitocondrial) de las especies estudiadas del género Plukenetia.

PARÁMETROS GENÉTICOS	ITS (Gen nuclear)	trnH-psbA (Gen
Nº de secuencias (N)	27	27
Nº de haplotipos (H)	6	5
Diversidad haplotípica (Hd)	0,823	0,806
Diversidad nucleotídica (π)	0,063	0,083
Nº total de sitios (excluyendo "gaps")	513	285
Nº total de mutaciones (Eta)	126	60
Media de las diferencias nucleotídicas entre pares de individuos (K)	32,342	23,729

3.1.3. Divergencia (distancia) genética

En las regiones analizadas, la diferenciación genética intraespecífica (dentro de las especies) del género *Plukenetia* fue nula (0,000), no observándose ninguna mutación al interior de las especies y morfotipo (Tabla 5 y 6). Los valores de diversidad interespecífica (entre especies) encontrados en el gen ITS fueron menores a los encontrados en el gen trnH-psbA. En este análisis *P. huayllabambana* y *P. carolis-vegae* no presentaron diferenciación genética entre ellas, en ninguna de las dos regiones analizadas ($D = 0,000$). Las menores distancias interespecíficas fueron encontradas estas dos especies con *P. volubilis* y *P. sp* morfotipo Cuzco (Tabla 5 y 6). En tanto que en las dos regiones analizadas las mayores distancias genéticas fueron presentadas entre *P. brachybotrya* y los demás grupos analizados (Tabla 5 y 6).

Tabla 5.

Divergencia intraespecífica e interespecífica de las especies estudiadas del género Plukenetia obtenida con el gen nuclear ITS.

Espece	1	2	3	4	5	6	7
1 <i>P. carolis-vegae</i>	0,000	0,000	0,006	0,004	0,084	0,169	0,107
2 <i>P. huayllabambana</i>		0,000	0,006	0,004	0,084	0,169	0,107
3 <i>P. volubilis</i>			0,000	0,010	0,086	0,169	0,107
4 <i>Plukenetia</i> sp. (morfofoto Cusco)				0,000	0,084	0,175	0,107
5 <i>P. polyadenia</i>					0,000	0,217	0,134
6 <i>P. brachybotrya</i>						0,000	0,199
7 <i>P. loretoensis</i>							0,000

Los valores en negrita (en la diagonal) representan la divergencia genética dentro de cada especie (distancia intraespecífica), los otros valores representan la divergencia genética entre las especies (distancia interespecífica).

Tabla 6.

Divergencia (distancia) intraespecífica e interespecífica de las especies estudiadas del género Plukenetia obtenida con el gen nuclear trnH-psbA.

Espece	1	2	3	4	5	6
1 <i>P. volubilis</i>	0,000	0,014	0,014	0,041	0,204	0,261
2 <i>P. carolis-vegae</i>		0,000	0,000	0,033	0,207	0,244
3 <i>P. huayllabambana</i>			0,000	0,033	0,207	0,244
4 <i>Plukenetia</i> sp. (morfofoto Cusco)				0,000	0,219	0,237
5 <i>P. loretoensis</i>					0,000	0,085
6 <i>P. brachybotrya</i>						0,000

Los valores en negrita (en la diagonal) representan la divergencia genética dentro de cada especie (Intraespecífica), los otros valores representan la divergencia genética entre las especies (Interespecífica).

3.1.4. Relaciones filogenéticas

Los árboles consenso de Máxima Verosimilitud (elaborados en base al modelo de evolución T92 + G) para el ITS como para la región *trnH-psbA* muestran la presencia de cuatro (A, B, C, D) y tres (A, B, C) clados o agrupaciones respectivamente (Figuras 17 y 18). En los dos árboles se observa que *P. brachybotrya* es la especie basal entre las especies de *Plukenetia* reportados hasta el momento para el Perú (grupos D y B respectivamente).

Estos árboles muestran también, que las especies comerciales de sachá inchi (*P. volubilis*, *P. carolis-vegae*, *P. huayllabambana*), además del morfotipo Cuzco están conformando un solo grupo o clado (grupo A), bootstrap = 94 en ITS y 100 en *trnH-psbA*. Este grupo está subdividido en tres subgrupos, el primero conformado por *P. carolis-vegae* y *P. huayllabambana* que no presentan diferenciación genética entre ellas; el segundo constituido por *P. volubilis* que es el subgrupo más próximo al primero; *Plukenetia* sp (morfotipo Cuzco) constituye el tercer grupo y es el más distante de los dos anteriores.

En los árboles consenso de ITS y *trnH-psbA* (Figuras 17 y 18), observamos que las especies *P. polyadenia*, *P. loretensis* y *P. brachybotrya* constituyen clados o grupos diferentes, inclusive se observa una fuerte diferenciación genética entre las especies enanas de sachá inchi (*P. loretensis* y *P. brachybotrya*).

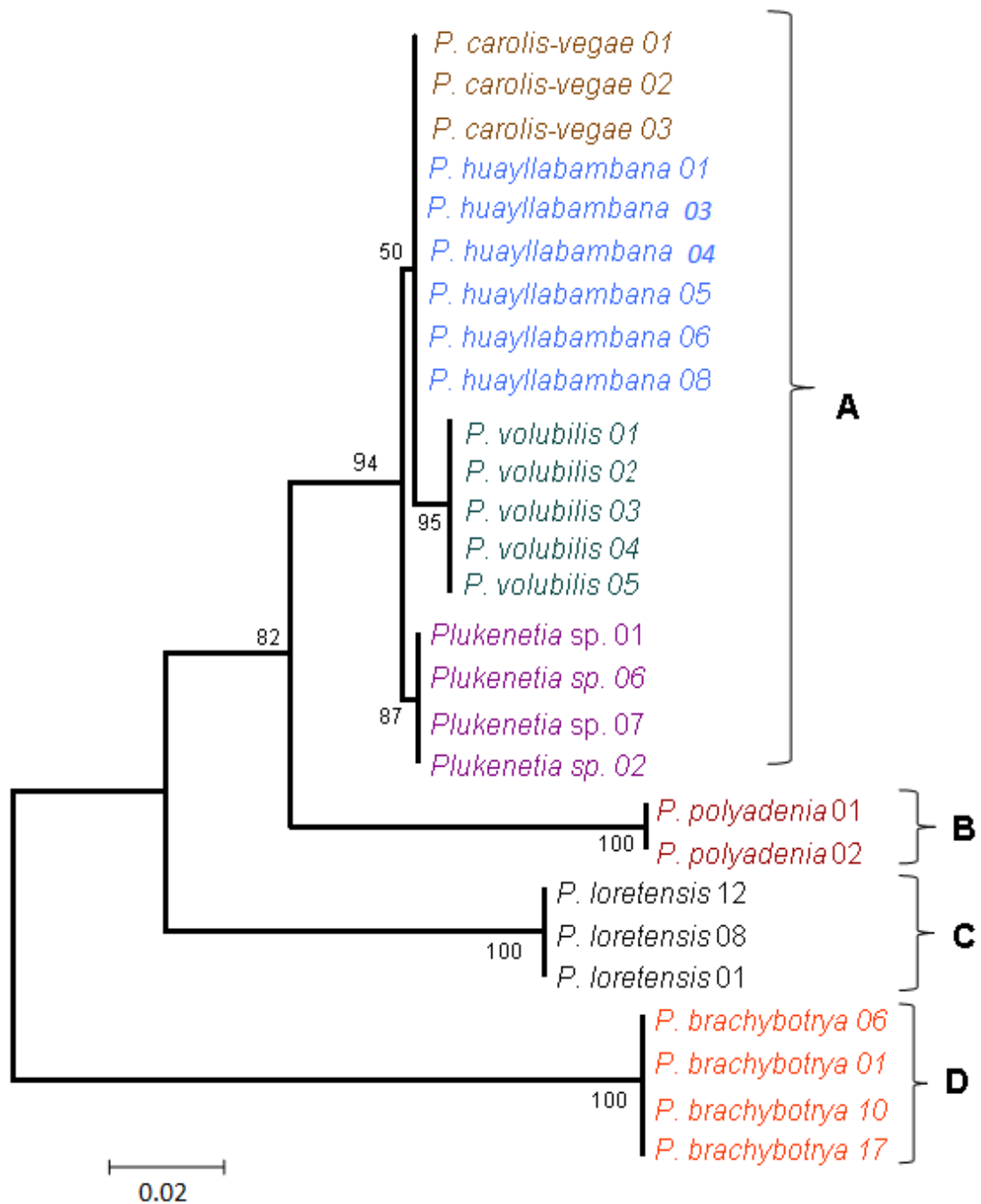


Figura 17. Árbol consenso de Máxima Verosimilitud del gen ITS para las seis especies de *Plukenetia* mas el morfotipo Cusco, este árbol fue elaborado de acuerdo al modelo T92 + G. Los valores de bootstrap mayores a 50% (1000 repeticiones), están representados en los nodos.

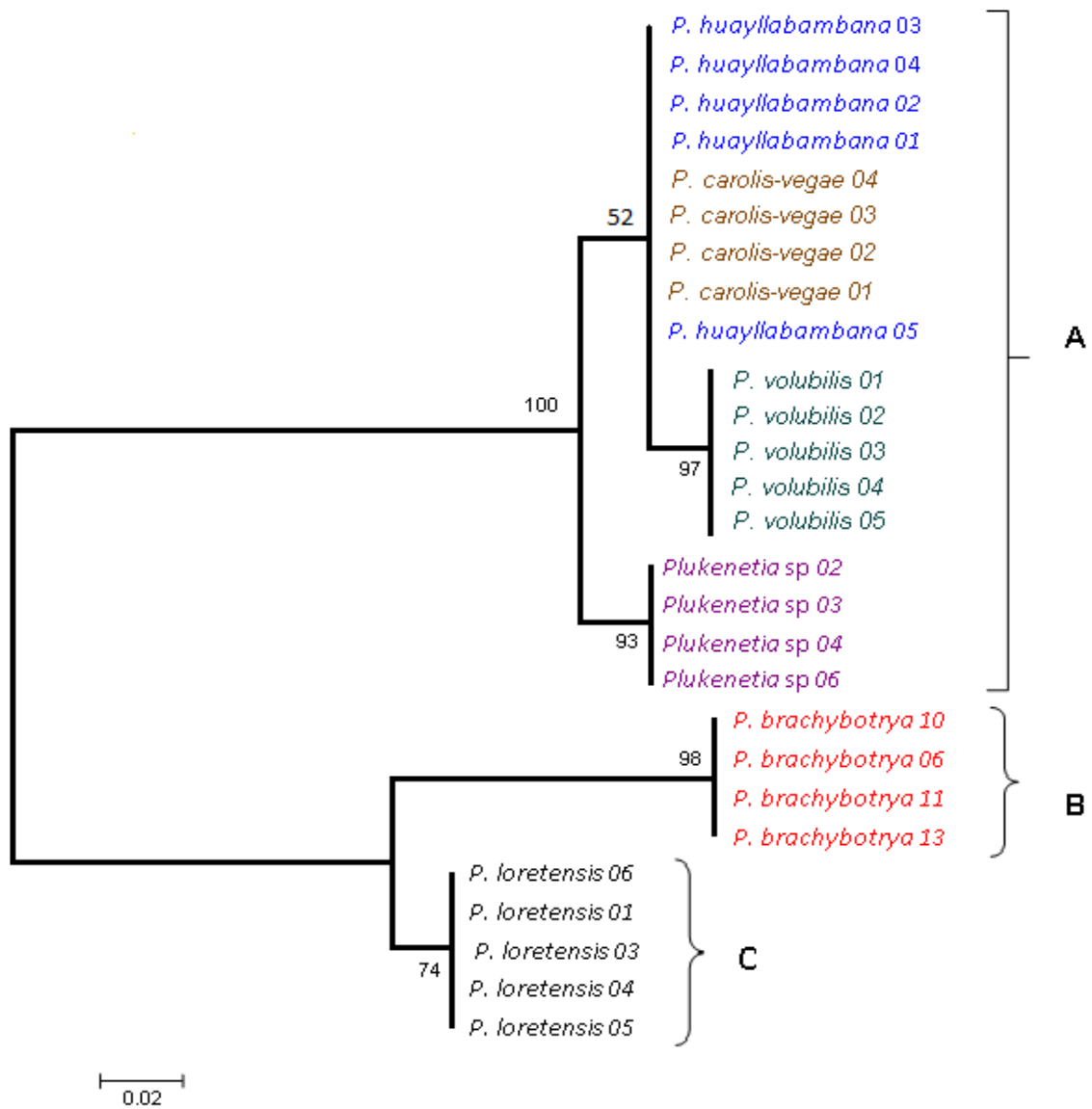


Figura 18. Árbol consenso de Máxima Verosimilitud del gen trnH-psbA para cinco especies de *Plukenetia* mas el morfotipo Cusco, este árbol fue elaborado de acuerdo al modelo T92 + G. Los valores de bootstrap mayores a 50% (1000 repeticiones), están representados en los nodos.

3.2. Discusión

El empleo de marcadores moleculares y secuencias nucleotídicas para estudios filogenéticos vienen siendo fomentado desde finales del siglo pasado, debido a que la historia evolutiva de cada ser vivo es marcado en su genoma (Sanna *et al.*, 2013). Marcadores moleculares y secuenciamiento nucleotídico vienen siendo utilizados para el esclarecimiento no solo de las relaciones filogenéticas en diferentes grupos de especies vegetales y animales (García-Ruíz, 2003; Román-Valencia & Vanegas-Ríos, 2009; Spooner, 2009; Roy *et al.*, 2010; Sirvas *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2012; García-Dávila *et al.*, 2013; Cadavid, 2013; Xu *et al.*, 2015), sino también en los estudios poblacionales para establecer el grado de relación entre las poblaciones de una determinada especie (García-Dávila *et al.*, 2005; Corazon-Guivin *et al.*, 2008; Ramírez-Valiente, 2010; Caruzo *et al.*, 2011; García-Aguilar, 2014) y para el mejoramiento genéticos de las mismas (Márquez-Sánchez *et al.*, 2009; Corazon-Guivin *et al.*, 2009; Márquez-Dávila *et al.*, 2013). En sacha inchi, marcadores moleculares universales DALP (Amplificación Directa de Polimorfismo de Longitud) fueron utilizadas para evaluar la diversidad genética en cinco poblaciones naturales de la región de San Martín, además para caracterizar genéticamente accesiones del banco de germoplasma de sacha inchi en la estación experimental del INIA en la ciudad de Tarapoto (Corazon-Guivin *et al.*, 2008 y 2009).

En cuanto a los estudios taxonómicos, hasta el 2008 para el Perú solo estaban reportadas cuatro especies dentro del género *Plukenetia*: *P. brachybotrya*, *P. lorentensis*, *P. polyadenia* y *P. volubilis* (Gillespie, 1993); siendo que el sacha inchi proveniente de la región Cusco y Amazonas eran consideradas como morfotipos de *P. volubilis* (*P. volubilis* morfotipo Cusco y *P. volubilis* morfotipo Amazonas). En el 2009 Bussmann y acompañantes, en base a caracteres morfológicos, describieron ha *P. volubilis* morfotipo Amazonas como una especie nueva y la que denominaron *P. huayllabambana*. Estudios moleculares basados en marcadores moleculares universales ISSR (Inter simple sequence repeats) y caracteres morfológicos (Rodríguez *et al.*, 2010), permitieron confirmar la identidad genética de las cinco especies descritas hasta ese momento. Nuestros resultados basados en secuencias nucleotídicas de las regiones ITS y trnH-psbA permiten también corroborar la entidad taxonómica de estas cinco especies, aportando además la información de estas regiones genoma del genero *Plukenetia* son altamente conservadas, es decir fueron observadas mutaciones solamente entre las diferentes especies, mas no entre los individuos de una

misma especie, es decir todas las secuencias de una misma especie fueron iguales en la composición de sus bases nucleotídicas.

Recientemente, Bussmann *et al.* (2013) describieron una nueva especie del género *Plukenetia* proveniente de la misma región de Amazonas (*P. carolis-vegae*). Los autores reportaron como principales caracteres diagnósticos o diferenciales entre las dos especies de *Plukenetia* de la región Amazonas, la diferencia en la textura y tamaño de la hoja, así como la diferencia en el tamaño del fruto. Nuestros resultados moleculares no muestran ninguna diferencia en la composición de bases nucleotídicas entre las secuencias de estas dos especies taxonómicas (distancia genética entre las dos especies = 0.000), es decir no se observa ni una sola mutación entre las secuencias nucleotídicas de los individuos de ambas especies en ninguna de las dos regiones analizadas, lo que nos permite afirmar que constituyen un mismo taxa genético. Entonces las diferencias morfológicas observadas entre estas dos especies que habitan relativamente cerca, podrían deberse a la plasticidad que presentan algunos caracteres morfológicos y que son influenciados generalmente por el medio ambiente, que, en este caso, podría ser la diferencia altitudinal (*P. huayllabambana* = 1676 m.s.n.m y *P. carolis-vegae* = 1854 m.s.n.m). Plasticidad en caracteres morfológicos ya fueron observados en otros grupos de plantas (Martíns, 2007; Pedroso *et al.*, 2009; Ramírez-Valiente, 2010; Li *et al.*, 2012; Villamizar-Cújar *et al.*, 2012).

Los árboles filogenéticos de las regiones ITS y trnH-psbA muestran, además, que *Plukenetia* sp morfotipo Cusco es una taxa genética diferente a *P. volubilis*, *P. huayllabambana* y *P. carolis-vegae*; lo que significaría que este morfotipo en realidad es una especie nueva hermana de *P. volubilis*, *P. huayllabambana* y *P. carolis-vegae* como afirmado por Rodríguez *et al.* (2010). También observamos que las especies comerciales de sacha inchi (*P. volubilis*, *P. huayllabambana* y *P. carolis-vegae* mas el morfotipo Cusco) forman parte de un grupo monofilético (clado A), es decir descienden de un ancestro común (Bootstrap: ITS = 94% y trnH-psbA = 100%). Este grupo según el árbol obtenido de la región ITS presentaría como grupo hermano a *P. polyadenia* (Bootstrap = 100%). Este resultado al contrario de lo reportado en Rodríguez *et al.*, (2010), corroboraría lo señalado por Gillespie (1993), quien afirmaba que *P. polyadenia* se encuentra más relacionado a *P. volubilis* que a *P. lorentensis* y *P. brachybotrya*.

Nuestros resultados muestran también que el sachá inchi *P. brachybotrya* considerado como sachá inchi enano por presentar frutos pequeños (según Rodríguez *et al.*, 2010, sus semillas tienen dimensiones 0,41 x 0,39 cm) es el grupo basal (grupo más distante genéticamente) de entre las especies de *Plukenetia* reportadas hasta el momento para la Amazonía peruana. Esta especie presenta grandes distancias genéticas con las otras especies, las distancias variaron entre 0,169 a 0,217 para ITS y 0,085 a 0,261 para trnH-psbA; inclusive presenta una fuerte distancia genética con *P. lorentensis* (ITS = 0,199 y trnH-psbA = 0,085), otra de las especies consideradas como sachá inchi enano (según Rodríguez *et al.*, 2010; las semillas presentan en media: 0,51 x 0,42 cm).

CONCLUSIONES

- El análisis de las secuencias nucleotídicas de la región nuclear ribosomal ITS y de la región cloroplástica trnH-psbA, permitieron corroborar la identidad genética de cinco de las seis especies taxonómicas del género *Plukenetia* descritas para el Perú en base a caracteres morfológicos: *P. brachybotrya*, *P. loretensis*, *P. polyadenia*, *P. volubilis*, *P. huayllabambana*.
- Tanto las secuencias de la región ITS como las de la región trnH-psbA muestran que la especie *P. carolis-vegae* no presenta diferencia en la composición de sus bases nucleotídicas con *P. huayllabambana*, lo que nos permite afirmar que constituyen una misma entidad taxonómica. Por lo que *P. carolis-vegae* constituiría una sinonimia de *P. huayllabambana*.
- *Plukenetia* sp. (morfotipo Cusco) presenta una identidad genética diferente de las especies *P. volubilis*, *P. huayllabambana* y *P. carolis-vegae*, lo que nos permite afirmar de que se trata de una especie nueva aun no descrita morfológicamente.

RECOMENDACIONES

- Realizar un estudio taxonómico para describir a *Plukenetia* sp. (morfotipo-Cusco) como una nueva especie de *Plukenetia* para la Amazonía peruana.
- Realizar una nueva revisión morfológica de *P. huayllabambana* y *P. carolis-vegae*, que incluya el análisis de un número mayor de especímenes y la revisión de las formulas florales de ambas especies, esto con la finalidad de determinar el estatus taxonómico de las mismas.
- Considerar estos resultados en los planes de conservación, manejo y mejoramiento de las especies del genero *Plukenetia* en el Perú.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguilar, J. (2002). *Especiación recombinacional y relaciones filogenéticas en *Saturaja macrostema* var. *laevigata**. Tesis doctoral. Universidad de Colima., Tecomán, Colima, México.
- Akaike, H. (1973). *Information theory and an extension of the maximum likelihood principle*. In: Petrov, B.N., Csaki, F. (Eds.), *Proceedings of the Second International Symposium on Information Theory*, Akadémia Kiado, Budapest, 1973, 267-281.
- Arjona, J. (2012). *Fitogeografía de dos endemismos cantábricos del género *Campanula* L. (Campanulaceae Juss): *C. adsurgens* Leresche & Levier y *C. arvatica* Lag*; Tesis de Licenciatura, Facultad de Biología, Universidad de Oviedo, 24pp.
- Ayala, F.; Fitch, W. & Clegg, T. (2000). *Variation and evolution in plants and microorganisms: Toward a new synthesis 50 years after Stebbins*. *Proc Natl. Aca. Sci. USA* 2000; 97: 6941-6944.
- Azofeifa-Delgado, A. (2006). *Uso de marcadores moleculares en plantas; aplicaciones en frutales del trópico*. *Agronomía Mesoamérica* 225 pp. Facultad de Ciencias Agroalimentarias, Universidad de Costa Rica.
- Baldwin, B.; Sanderson, M.; Porter, J.; Wojciechowski, M.; Campbell, C. & Donoghue, M. (1995). *The ITS region of nuclear ribosomal DNA: A valuable source of evidence on angiosperm phylogeny*. *Annals Missouri Botanical Garden* 82: 247-277.
- Benítez, C.; Cardozo, A.; Hernández, L.; Lapp, M.; Rodríguez, H.; Ruiz, T. & Torrecilla, P. (2006). *Botánica Sistemática "Fundamentos para su estudio" Cátedra de Botánica Sistemática*. Facultad de Agronomía. Universidad Central de Venezuela. Maracay - Venezuela.
- Bentley, D.R.; Balasubramanian, S.; Swerdlow, H.P.; Smith, G.P.; Milton, J.; Brown, C.G.; Hall, K.P.; Evers, D.J.; Barnes, C.L.; Bignell, H. R. *et al.* (2008). *Accurate whole genome sequencing using reversible terminator chemistry*. *Nature* 457, 974 – 975.

- 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.
- Bussmann, R.; Tellez, C. & Glenn, A. (2009). *Plukenetia huayllabambana* sp. nov. (Euphorbiaceae) from the upper Amazon of Peru. Nordic Journal of Botany 27:313–315.
- Bussmann, R.; Paniagua, N. and Tellez, C. (2013). *Plukenetia carolis-vegae* (Euphorbiaceae) – A new useful species from northern Peru. Notes on Economic Plants.
- Cadauid, I. (2013). Tesis magistral: *Tipificación molecular y separación de especies de plantas del subgénero Leptostemonum (Solanaceae: Solanum)*, usando regiones barcode. Universidad Nacional de Colombia, Medellín Colombia.
- Carpenter, J. & Wheeler, W. (1999). Towards simultaneous analysis of morphological and molecular data in *Hymenoptera*. Zoologica Scripta 28: 251-260.
- Caruzo, M.; van Ee, B.; Cordeiro, I.; Berry, P.; Riina, R. (2011). *Molecular phylogenetics and carácter evolution of the “sacaca” Novel relationships of Croton section Cleodora (Euphorbiaceae), Sau Paulo – Brazil*.
- Cavalli-Sforza, L.L. & Edwards, A.W. (1967). *Phylogenetic analysis. Models and estimation procedures*. Am J Hum Genet. 19:233-57.
- Corazon-Guivin, M. (2009). *Estudio de la Variabilidad Genética en poblaciones naturales de Sacha Inchi Plukenetia Volubilis L. (Euphorbiaceae) de la región San Martín*. Tesis de pre-grado. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de San Martín – Tarapoto.
- Corazon-Guivin, M.; Rodríguez, Á.; Cachique, D.; Chota, W.; Vásquez, G.; Del Castillo, D.; Renno, J.F.; García-Dávila, C. (2008). *Diversidad genética en poblaciones naturales de sachá inchi Plukenetia volubilis L. (EUPHORBIACEAE) en el departamento de San Martín (Perú)*. Folia Amazónica 17: 1-2.
- Corazon-Guivin, M.; Castro-Ruiz, D.; Chota-Macuyama, W.; Rodríguez, Á.; Cachique, D.; Manco, E.; Del-Castillo, D.; Renno, J.F.; García-Dávila C. (2009). *Caracterización genética de accesiones san martinenses del banco nacional de*

germoplasma de sacha inchi Plukenetia volubilis L. (E.E. El Porvenir – INIA).
Folia Amazónica 18: 23-31.

Cuéllar-Martínez, M. (2011). *Código de barras genéticos de algunas Orquídeas Veracruz bajo riesgo de extinción*. Facultad de Biología. Universidad Veracruzana. Veracruz – México.

Cuevas, E. (2012). *Mecanismo de especiación ecológica en plantas y animales*. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán.

Darwin, C. (1859). *On the Origin of Species by Means of Natural selection, or the Preservation of Favoured Races in the Struggle for Life*. London.

De Luna, E.; Guerrero, J. & Chew, T. (2005). Sistemática biológica: *Avances y direcciones en la teoría y los métodos de la reconstrucción filogenética*. Hidrobiología, vol. 15, pp. 351 – 370. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, México.

Dieckmann, U. & Doebeli, M. (1999). *On the origin of species by sympatric speciation*. Nature 400, 353 – 357.

Dobzhansky, T. (1937). *Genetics and the origin of species*. Columbia University Press, New York.

Doyle, J.J. & Doyle, J. L. (1987). *A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue*. Phytochem. Bull., 19:11-15.

Eldredge, N. & Cracraft, J. (1980). *Phylogenetic patterns and the evolutionary process*. Columbia Univ. Press, New York.

Endeler, J. (1986). *Natural selection in the wild*. Princeton University Press, Princeton.

Felsenstein, J. (1981). *Evolutionary tree from DNA sequences: a maximum likelihood approach*. J. Mol. Evol. 17:368-376.

Felsenstein, J. (1988). *Phylogenies from molecular sequences*. Annu. Rev. Genet., 22: 521 – 565.

Felsenstein, J. (2004). *Inferring phylogenies*. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.

- Fisher, R. (1930). *The Genetical Theory of Natural Selections*. Clarendon Press, Oxford.
- Frost, D. & Kluge, A. (1994). *A consideration of epistemology in systematic biology, with special reference to species*. *Cladistics* 10: 259-294.
- García-Aguilar, M.A. (2014). *Variación genética de tres especies silvestres de género *Hylocereus* (Berger) Britton & Rose (Cactaceae) en México con base en secuencias de *matK*, *rbcL*, *psbA*, *trnL-F* e *ITS**. Tesis doctoral. Instituto de enseñanza e investigación en ciencias agrícolas, Texcoco – México.
- García-Dávila, C.; Magalhães, C.; Hurtado-Guerrero, J.C. (2005). *Morphometric variability in populations of *Palaemonetes* spp (Crustacea, Decapoda, Palaemonidae) from the Peruvian and Brazilian Amazon Basin*. *Iheringia, Sér. Zool.*, Porto Alegre, 95(3):327-334.
- García-Dávila, C.; Duponchelle, F.; Castro-Ruiz, D.; Villacorta, J.; Quérrouil, S.; Chota-Macuyama, W.; Núñez, J.; Römer, U.; Carvajal-Vallejos, F. y Renno, J. F. (2013). *Molecular identification of cryptic species in the Anzonian predatory catfish genus *Pseudoplatystoma* (Bleeker, 1962) from Peru*. Springer Science+Business.
- García-Ruíz, I. (2003). *Relación interespecífica del género *Pachyphytum* (Crassulaceae), empleando marcadores genéticos AFLP*. Universidad de Colombia, Tecoman – Colombia.
- Gillespie, L. (1993). *A synopsis of Neotropical *Plukenetia* (Euphorbiaceae) including two new species*. *Systematic Botany* 18 (4): pp. 575 – 592.
- Gillespie, L. & Armbruster, W. (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.
- Gillespie, L. (2007). *A Revision of Paleotropical *Plukenetia* (Euphorbiaceae) including two new species*. *Systematic Botany* 32 (4): pp. 780– 802.

- González, M.; Baraloto, C.; Engel, J.; Mori, S.; Pétronelli, P.; Riéra, B.; Roger, A.; Thébaud, C. & Chave, J. (2009). *Identification of Amazonian trees with DNA barcodes*. PLoS One 4, e7483.
- Goaverts, R.; Frodin D. & Stevens, P. (2000). *World Checklist Bibliography of Euphorbiaceae (With Pandaceae)*. Royal Botanic Gardens, Kew.
- Hall, T. (1999). Bio Edit: *a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT*. Nucl. Acids. Symp. Ser. 41:95-98.
- Harrison, R. (2001). *Variation, within species: introduction*. Encyclopedia of Life Sciences/www.els.net.
- Holder, M.; Lewis, P., (2003). *Phylogeny estimation: traditional and bayesian approaches*, Nature Reviews Genetics, vol. 4, pp. 275-284.
- Hollingsworth, P.M.; Forrest, L.L.; Spouge, J.L.; Hajibabaei, M.; Ratnasingham, S.; Van Der Bank, M.; Chase, M.W.; Cowan, R.S.; Erickson, D.L.; Fazekas, A.J., (2009). *A DNA barcode for land plants*. Proceedings of the National Academy of Sciences 106, 12794–12797.
- Hollingsworth, P.M.; Graham, S.W. & Little, D.P. (2011). *Choosing and Using a Plant DNA Barcode*. PLoS ONE 6, e19254.
- IIAP, (2009). *Estudio de viabilidad económica del cultivo de Plukenetia volubilis Linneo, sacha inchi, en el departamento de San Martín*. Avances Económicos N° 3. Iquitos - Perú.
- Ji, S.; Huo, K.; Wang, J. & Pan, S. (2008). *A molecular phylogenetic study of Huperziaceae based on chloroplast rbcL and psbA-trnH sequences*. Journal of Systematics and Evolution 46, 213–219.
- Jiménez-Escrig, A.; Gobernado, I.; Sánchez-Herranz, A. (2012). *Secuenciación del genoma completo: un salto cualitativo en los estudios genéticos*. Rev Neurol; 54: 692-8.
- Judd, W.; Campbell, C.; Kellog, E. & Stevens, P. (1999). *Plant Systematics: A Phylogenetic Approach*. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, MA, USA. 464 pp

- Kalliola, R. (1993). *Amazonía Peruana, vegetación húmeda tropical en el llano sub-andino*. Proyecto Amazonía, Universidad de Turku; Turku, Finlandia. 265 pp.
- Karp, A. & Edwards, K. (1998). *DNA markers: a global overview*. In: G. Caetano-Anollés, P.M. eds. *DNA markers: protocols, applications and overviews*. Gress-hoff. New York. p. 1-13.
- Kondrashov, A. & Kondrashov, F. (1999). *Interactions among quantitative traits in the course of sympatric speciation*. *Nature* 400, 351 – 354.
- Kress, W.J.; Wurdack, K.J.; Zimmer, E.A.; Weith, L.A.; Janzen, D.H., (2005). *Use of DNA barcodes to identify flowering plants*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 102, n.23, p.8369–74.
- Kress, W.J.; Erickson, D.L. (2007). *A Two-Locus Global DNA Barcode for Land Plants: The Coding *rbcL* Gene Complements the Non-Coding *trnH-psbA* Spacer Region*. *PLoS ONE* 2, e508.
- Lanteri, A.; Fernandez, L. y Gallardo, F. (2006). *Sistemática biológica Fundamentos teóricos y ejercitaciones*. “Generalidades y conceptos básicos”, 3° edición. Universidad Nacional de La Plata, Argentina.
- León, B.; Riina, R. y Berry, P. (2006). *Euphorbiaceae endémicas del Perú*. *Rev.peru.biol* Facultad de Ciencias Biológicas UNMSM. Lima – Perú.
- Li, H., Chen, J., Wang, S., Xiong, S., (2012). *Evaluation of six candidate DNA barcoding loci in Ficus (Moraceae) of China*. *Molecular Ecology Resources*.
- Librado, P. & Rozas, J. (2009). *DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data*. *Bioinformatics* 25: 1451-1452.
- Liston, A.; Robinson, W.; Oliphant, J. & Álvarez-Buyila, E. (1996). *Length variation in the (nuclear ribosomal DNA internal) transcribed spacers of non-flowering seed plants*. *Syst Bot* 21: 1-12.
- Maniatis, T.; Fritsch, E.F.; Sambrook, J. (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual*. (2nd ed.). Cold spring harbor laboratory, New York, U.S.A.

- Márquez-Sánchez, F.; Sahagún-Castellanos, L.; Barrera-Gutiérrez, E. (2009). *Nuevo método de mejoramiento genético para resistencia a sequía en maíz*. Revista de Geografía Agrícola, núm. 42, 9-14 pp. Universidad Autónoma Chapingo Texcoco, México.
- Marquez-Dávila K.; Gonzales, R.; Arévalo, Solis, L. (2013). Respuesta de accesiones de sachá inchi *Plukenetia volubilis* L. a la infestación inducida del nematodo *Meloidogyne incognita* (Kofoid and White, 1919) Chitwood, 1949. *Folia Amazónica*. 22: 97 – 103.
- Martíns, P. (2007). *Plasticidad fenotípica de Pinus pinaster frente a la disponibilidad de nutrientes*. Universidad de Santiago de Compostela.
- Mayr, E. (1942). *Systematics and the origin of species*. Columbia University Press, New York.
- Mishler, B. D. & Luna, E., (1997). *Sistemática Filogenética el Concepto de Especie*. Bol. Soc. Bot. México 60: 45-57 pg.
- Mobot, (2007). *Missouri Botanical Garden*. Saint Louis, Missouri, EUA <http://mobot.mobot.org/W3T/Search/vast.html>.
- Molineros, F. (2012). *Caracterización morfológica y filogenia del género Vanilla en el distrito de Buenaventura-Valle del Cauca* (Colombia). Universidad Nacional de Colombia sede Palmira.
- Mosseau, T. & Olvido, A. (2001). *Geographical variation*. Encyclopedia of Life Sciences/www.els.net.
- Nei, M. (1987). *Molecular evolutionary genetics*. Columbia University Press, New York, NY, USA; 512p.
- Nei, M. & Kumar, S. (2000). *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, New York.
- Otte, D. (2001). *Species and speciation*. Encyclopedia of Life Sciences/www.els.net.

- Pang, X.; Liu, C.; Shi, L.; Liu, R.; Liang, D.; Li, H.; Cherny, S.S. & Chen, S. (2012). *Utility of the trnH-psbA Intergenic Spacer Region and Its Combinations as Plant DNA Barcodes: A Meta- Analysis*. PLoS ONE 7, e48833.
- Pedroso, H.L.; Rocha-Filho, L.C.; Lomônaco, C. (2009). *Variación fenotípica de plantas del Cerrado (Sabana brasileña) frente a la heterogeneidad ambiental*. Instituto de Biología da Universidade Federal de Uberlândia, Minas Gerais, Brasil. 38.400-902.
- Peña, C. (2011). *Métodos de inferencia filogenética*. Facultad de Ciencias Biológicas UNMSM. *Rev. peru. biol.* 18 (2): pp; 265 – 267.
- Peña-Castro, J.M.; Gregorio-Ramírez, O.; Barrera-Figueroa, B.E. (2013). *Los métodos experimentales que permiten el estudio de las macromoléculas de la vida: historia, fundamentos y perspectivas*. Universidad Nacional Autónoma de México, Educ. quím., 24(2), 237-246.
- Perfectti, F. (2002). *Especiación, modos y mecanismos. Evolución la base de la biología*. Departamento de genética, Universidad de Granada, España.
- Ramírez-Valiente, J.A. (2010). *Plasticidad fenotípica y diferenciación genética inter- e intrapoblacional en Quercus suber L.: Evaluación mediante caracteres fisiológicos y marcadores moleculares*. Universidad politécnica de Madrid – España.
- Rallo, P.; Belaj, A.; De La Rosa, R. & Trujillo, I. (2002). *Marcadores moleculares* (en línea). Córdoba, España. Consultado 1 ago. 2002.
- Reznick, D. (2001). *Natural Selection*. Encyclopedia of Life Sciences/www.els.net.
- Rodríguez, A. (2010). *Relaciones filogenéticas del género Plukenetia Linnaeus, 1753 (EUPHORBIACEAE) y estudio filogeográficos de Plukenetia volubilis L. en la Amazonía peruana*.
- Rodríguez, A.; Corazon-Guivin, M.; Cachique, D.; Mejía, K.; Del Castillo, D.; Renno, J.F., y García-Dávila, C. (2010). *Diferenciación morfológica y por ISSR (Inter simple sequence repeats) de especies del género Plukenetia (Euphorbiaceae) de la Amazonía peruana: propuesta de una nueva especie*. Román-Valencia, C. &

- Vanegas-Ríos, J. A. (2009). *Phylogenetic and biogeographic analysis of species the genus Bryconamericus (Characiformes, Characidae) from lower Central America*. Universidad del Quindío, Colombia.
- Roy, S., Tyagi, A., Shukla, V., Kumar, A., Singh, U., Chaudhary, L., Datt, B., Bag, S., Singh, P., Nair, N., (2010). Universal plant DNA barcode loci may not work in complex groups: *a case study with Indian Berberis species*. PloS One 5, e13674.
- Sanna, D.; Biagi, F.; Alaya, H.B.; Maltagliati, F.; Addis, A.; Romero, A.; De Juan, J.; Quignard, J.P.; Castelli, A.; Franzoi, P.; Torricelli, P.; Casu, M.; Carcupino, M. and Francalacci, P. (2013). Mitochondrial DNA variability of the pipefish *Syngnathus abaster*. Journal of Fish Biology © 2013 The Fisheries Society of the British Isles, doi:10.1111/jfb.12027
- Santhosh-Kumar, J.U; Krishna, V.; Seethapathy, G.S.; Senthilkumar, U.; Ragupathy, S.; Ganeshiah, K.N.; Ganesan, R.; Newmaster, S.G; Ravikanth, G.; Uma-Shaanker, R., (2015). *DNA barcoding to assess species adulteration in raw drug trade of “Bala” (genus: Sida L.) herbal products in South India*. Biochemical Systematics and Ecology.
- Shaw, J.; Lickey, E.B.; Beck, J.T.; Farmer, S.B.; Liu W, *et al.* (2005). *The tortoise and the hare II: Comparison of the relative utility of 21 non-coding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis*. Am J Bot 92: 142–166.
- SIDTA. (1999). *Los marcadores moleculares en ingeniería genética y en mejora vegetal*. España. Consultado 1 agosto 2002.
- Sirvas, S.; Briceño, E.; Gamero, B.; Nuñez, J.; Duponchelle, F.; Díaz, C. & Renno, J.F. (2011). Polimorfismo molecular de la variación de la longitud de los intrones (EPIC-PCR) en *Apistogramma* sp., peces ornamentales de la Amazonía peruana. IRD –Institut de Recherche pour le Développement. Lima - Perú.
- Soler, M. (2002). *La evolución y la biología evolutiva. Departamento de biología animal y ecología, Facultad de ciencias, Universidad de Granada – España*.
- Spooner, D. (2009). *DNA barcoding will frequently fail in complicated groups: An example in wild potatoes*. American Journal of Botany 96, 1177–1189.

- Sugiura, M. (1992). *The chloroplast genome*. Plant molecular biology 19, 149–168.
- Sun, Y.; Skinner, D.Z.; Liang, G.H.; Hulbert, S.H. (1994). *Phylogenetic analysis of Sorghum and related taxa using internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA*. Theoretical and Applied Genetics 89: 26-32.
- Swofford, D.; Olsen, G.; Waddell, P. & Hillis, D. (1996). *Phylogenetic inference*. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, pp. 407-514.
- Tamura, K.; Stecher, G.; Peterso, D.; Filipinski, A. y Kumar, S. (2013). *MEGA 6: Evolutionary Genetics Analysis version 6.0*. Molecular Biology and Evolution 30: 2725 -2729.
- Tinnaut, A. & Ruano, F. (2002). *Biodiversidad, clasificación y filogenia*. Universidad de Granada, España.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. (1994). *Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight choice*. Nucleic Acids Res. 1994; 22:4673-4680.
- Vaco, A. (2011.) *Diferenciación genética e hibridación en especies de género Baccharis L. Facultad de Ciencias*. Universidad de la República. Montevideo – Uruguay.
- Valadez, E. & Kahl, G. (2000). *Huellas de ADN en genomas de plantas*. Universidad Autónoma Chapingo. México.
- Villamizar-Cújar, J.M.; Rodríguez-López, N.F; Tezara-Fernández, W. (2012). *Plasticidad fenotípica en plantas de Lippia dulcis (Verbenaceae) sometidas a déficit hídrico*. Acta biol. Colomb., 17: 363 -378.9
- Wang, N.; Jacques, F.; Milne, R.; Zhang, C.; Yang, J. (2012). *DNA barcoding of Nyssaceae (Cornales) and taxonomic issues*. Botanical Studies 53, 265–274.
- Webster, G. (1994). *Synopsis of the genera and suprageneric taxa of Euphorbiaceae*. Ann. Mo. Bot. Gard. 54: 211-350.
- Wood, T. & Rieseberg, L. (2001). *Speciation: Introduction Encyclopedia of Life Sciences/www.els.net*.

- Xu, S.; Li, D.; Li, J.; Xiang, X.; Jin, W.; Huang, W.; Jin, X. & Huang, L. (2015). Evaluation of the DNA Barcodes in *Dendrobium* (Orchidaceae) from Mainland Asia. PLoS ONE 10(1): e0115168. doi: 10.1371/journal.pon.0115168.
- Yang, Z. (1996). *Phylogenetic analysis using parsimony and likelihood methods*. J.Mol.Evol., 42: 294 – 307.
- Zamora, C. (2002). *Evidencias a favor de la evolución*. Departamento de Biología Animal y Ecología, Facultad de Ciencias. Universidad de Granada.
- 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.

Anexo

Anexo 1: 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***

Glosario

ADN (Ácido desoxirribonucleico): Es la molécula portadora la información genética, que posibilita su transmisión de una generación a la siguiente.

ADN ribosomal: Son secuencias que codifican para el RNA ribosomal y contienen segmentos de secuencias transcritas y no transcritas.

Amplificación: Cualquier proceso que causa la replicación de una secuencia concreta de ADN en cantidad desproporcionadamente elevada.

Ancestro. Es un grupo de antepasados relacionados a un antepasado directo del cual desciende o cree descender un individuo.

Análisis del haplotipo: Estudio de genética molecular para identificar un conjunto de segmentos de ADN que están estrechamente relacionados en su modo de herencia (ligados). Se utiliza en el análisis de ligamiento o cuando un rasgo o característica determinados presentan desequilibrio de ligamiento con un marcador genético o un grupo de marcadores.

Ápice: Extremo, punta terminal, parte distal de la base, situada en el extremo superior de la planta.

Apomorfo: Carácter derivado de un estado ancestral. Por ejemplo, la presencia de alas en los insectos es apomorfo ya que deriva de un estado anterior sin alas.

Árbol filogenético: Gráfico que representa las relaciones filogenéticas entre los diferentes taxones tal como son entendidas por un investigador particular. Es una hipótesis sobre las relaciones filogenéticas de un taxón.

Biodiversidad: Es la variedad de formas de vida que se desarrollan en un ambiente natural. Esta variedad de formas de vida sobre la tierra involucra a todas las especies de plantas, animales, microorganismos y su material genético.

Cebador – Primer: Una secuencia corta de oligonucleótidos que se utiliza en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la creación de moléculas más largas de ADN.

Cladograma: Esquema dicotómico que muestra una hipótesis sobre las relaciones filogenéticas de varios taxones.

Clasificación: Acción de ordenar los seres vivos en grupos, es decir, distribuirlos por categorías en función de las relaciones de parentesco.

Delación. Alteración genética consistente en la pérdida de un segmento de ADN. Su magnitud es variable, pudiendo ser tan pequeñas como un solo par de bases o tan grandes que afecten a uno o más genes.

Dendrograma: Cualquier diagrama semejante a un árbol.

Denaturación: Separación de las dos hebras de DNA que se consigue por calor o por aumento del pH, y que cambia muchas de las propiedades físicas del DNA.

Divergencia genética. Es una fuerza evolutiva que actúa junto con la selección natural cambiando las frecuencias alélicas de las especies en el tiempo.

Endémica: Planta que es propia exclusivamente de determinado país, de una cordillera, de una isla, etc. etc.

Especie: Es el grupo de organismos que pueden reproducirse y producir descendencia fértil.

Especiación: Incremento del número de especies en un grupo.

Evolución: es el cambio en herencia genética fenotípica y genotípica de las poblaciones biológicas a través de las generaciones.

Exón: Secuencia codificante de ADN.

Extensión. Actúa la polimerasa, tomando el ADN molde para sintetizar la cadena complementaria y partiendo del cebador como soporte inicial necesario para la síntesis de nuevo ADN.

Fenotipo: Características físicas y/o bioquímicas observables de la expresión de uno o varios genes. Conjunto de rasgos clínicos de un individuo con un genotipo determinado.

Filogenia: Historia del desarrollo evolutivo de las especies. Curso histórico de la descendencia de los seres vivos.

Filogenética. Es una clasificación científica de las especies únicamente en las relaciones de proximidad evolutiva entre las distintas especies, reconstruyendo la historia de su diversificación desde el origen de la vida en la tierra hasta la actualidad.

Gen: Unidad que conserva datos genéticos, se encarga de transmitir la herencia a los descendientes.

Genoma: Conjunto de los genes de un individuo.

Genotipo: Constitución genética de un organismo o célula.

Grupo monofilético: Cuando las especies tienen un antepasado común.

Haplotipo: Conjunto de alelos contenidos en un locus (o en varios loci) de una misma dotación haploide.

Herencia. Es donde los caracteres hereditarios, físicos y mentales, se transmiten de una generación a otra, regidos por las leyes de la herencia, enunciadas por Mendel.

Hibridación: Es un proceso por el cual se combinan dos cadenas de ácidos nucleicos antiparalelas y con secuencias de bases complementarias en una única molécula de doble cadena, que toma la estructura de doble hélice.

Homología. Es la relación que existe entre dos partes orgánicas diferentes con mismo origen evolutivo.

Inserción: Anomalía cromosómica en la que el material de un cromosoma se inserta en otro cromosoma; mutación en la que se inserta un segmento de ADN en un gen o en otro segmento de ADN, alterando potencialmente la secuencia codificante.

Intrón: Secuencia no codificante de ADN que se transcribe a ARN mensajero (ARNm) en su estado inmaduro.

Molécula: conjunto de átomos unidos unos con otros por enlaces fuertes. Es la expresión mínima de un compuesto o sustancia química.

Mutación: Cualquier alteración de la secuencia normal de un gen o más de un gen.

PCR (reacción en cadena de la polimerasa): Procedimiento que genera millones de copias de un segmento corto de ADN mediante ciclos repetidos.

Polimorfismo: Variaciones naturales en un gen sin efectos adversos sobre el individuo. Alcanzan al menos una frecuencia del 1% en la población general.

Secuenciación: Proceso mediante el cual se determina la secuencia de nucleótidos en un segmento de ADN.

Sistemática filogenética. Es una rama de la biología que define las relaciones evolutivas entre los organismos basándose en similitudes derivadas.

Taxón: Grupo de organismos a los que se da un nombre.

Traducción: Proceso por medio del cual se lee la secuencia de codones del ARN y se elabora una cadena de proteína, con la secuencia correspondiente, de acuerdo con el código genético.

Transcripción: Proceso por el que un gene se expresa mediante la síntesis de un ARN que contiene la misma secuencia del gene.