

**UNIVERSIDAD RICARDO PALMA**

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



**“Caracterización de la Variabilidad Genética  
de *Jatropha curcas* de la Regiones de San  
Martín y Ucayali mediante el uso del Marcador  
Molecular ISSR”**

Tesis para optar el Título de Licenciada en Biología

Marianella Ayala Richter

Lima 2011

## *DEDICATORIA*

Dedico este manuscrito a mis amados padres Isabel y Elio, mis hermanas Aldara, Sandra, Yicela, Verónica y mis hermanos Fernando y John por su incondicional amor y constante apoyo que me manifestaron desde siempre; porque son la columna vertebral de mi vida.

A ti Alan, mi compañero incondicional, que ilumina siempre mis días.

# AGRADECIMIENTOS.

Quiero agradecer enormemente al Dr. Luis De Stefano Beltrán, quien tuvo la confianza de otorgarme esta investigación, y por ser un ejemplo de admiración, trabajo y esfuerzo constante, en el camino duro de la investigación. ¡Gracias por guiarme!

A mi muy estimado profesor y asesor Dr. Mauro Quiñones Aguilar, por sus acertados consejos y observaciones de mi trabajo, por hacer grato mi periodo de aprendizaje durante mi pre grado y orientarme siempre a seguir estudiando e investigando.

A mis compañeros de laboratorio, de la Unidad de Genómica, Antoine y Mónica, porque cada vez que los necesito siempre me apoyan. Un agradecimiento especial a Luís y Savina porque siempre me ayudaron en el trabajo practico y experimental, con quienes compartí y comparto largas y gustosas horas de trabajo.

Esta tesis fue financiada en su totalidad gracias a INCAGRO, institución gubernamental que brindó su apoyo a esta investigación

# ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AFLP	Polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados (Amplified Fragment Length Polymorphism)
BrEt	Bromuro de etido
CTAB	Bromuro de hexadeciltrimetilamonio
dATP	2'-desoxiadenosina-5'-trifosfato
dCTP	2'-desoxicitidina-5'-trifosfato
dGTP	2'-desoxiguanosina-5'-trifosfato
dTTP	2'-desoxitimidina-5'-trifosfato
dNTP	2'-desoxirribonucleósido-trifosfato
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ISSR	Inter- microsatelites (Inter Simple Sequence Repeat)
ng	Nanogramos
NTSYSpc	Programa para análisis multivariados.
OTU	Unidades taxonómicas operacionales (Operational taxonomic units)
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction)
PIC	Índice de contenido polimórfico (Polymorphic Index Content)
RAPD	Amplificación de fragmentos de ADN usando partidores de diseño aleatorio (Random Amplified Polymorphic DNA)
RFLP	Polimorfismo en la longitud de fragmentos de restricción. (Restriction Fragment Length Polymorphism)
RNA	Ácido ribonucleico
RNasa	RNA nucleasa
SSR	Microsatélites (Simple Sequence Repeat)
Tris-HCl	Hidrocloreuro de tris(hidroximetil)-aminometano
TAE	TRIS-HCl + Ácido Acético Glacial + EDTA (Tris base, acetic acid and EDTA)
U	Unidades enzimáticas
ul	Micro litros
UPGMA	Sin ponderar Grupo Par Método con media aritmética (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean)
UV	Ultra violeta

# ÍNDICE

<b>AGRADECIMIENTOS.</b>	<b>3</b>
<b>ABREVIATURAS</b>	<b>4</b>
<b>ÍNDICE</b>	<b>5</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	<b>7</b>
<b>ÍNDICE TABLAS</b>	<b>8</b>
<b>RESUMEN.</b>	<b>9</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>10</b>
<b>I. INTRODUCCION</b>	<b>11</b>
<b>II. ANTECEDENTES</b>	<b>13</b>
2.1. Hábitat y Centro de Origen.	13
2.2. Descripción Botánica.	14
2.3. Taxonomía y Nomenclatura.	15
2.4. Usos y Potencialidades.	16
2.5. Toxicidad	16
2.6. Recurso Genético de <i>J. curcas</i>	16
2.7. Marcadores Moleculares.	18
2.8. Fundamente de la Técnica de los ISSR's.	21
2.9. Capacidad de detección de polimorfismos a nivel del genoma.	22
2.10. Usos y Aplicaciones.	22
2.11. Aplicación de la Fenética o Taxonomía Numérica.	26
2.12. Estudio de variabilidad poblacional.	26
2.13. Análisis de la variabilidad genética y poblacional.	27

<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>29</b>
3.1. Obtención de la muestra.	29
3.2. Extracción del ADN.	29
3.3. Pureza y concentración de ADN.	30
3.4. Análisis ISSR-PCR.	30
3.5. Electroforesis.	31
3.6. Construcción de la Matriz Binaria.	32
3.7. Coeficiente de similitud.	32
3.8. Análisis multivariado.	34
<b>IV. RESULTADOS</b>	<b>35</b>
4.1. Extracción de ADN	35
4.2. Elección de los primers.	35
4.3. Análisis con el marcador molecular ISSR.	36
4.4. Análisis Diversidad de la población.	37
4.5. Análisis de similitud.	40
4.6. Correlación de las matrices de similitud.	42
4.7. Análisis de coordenadas principales.	43
<b>V. DISCUSIÓN</b>	<b>44</b>
<b>VI. CONCLUSIONES</b>	<b>48</b>
<b>VII. RECOMENDACIONES</b>	<b>49</b>
<b>VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>50</b>
<b>ANEXO A</b>	<b>71</b>
<b>ANEXO B</b>	<b>72</b>
<b>GLOSARIO</b>	<b>74</b>

# ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Distribución geográfica de <i>J. curcas</i> a nivel mundial (Münch 1986).	13
<b>Figura 2.</b> Morfología de <i>Jatropha curcas</i> a) ramas con flores; b) corteza; c) venas de la hoja; d) flores con pistilos; e) flor con estambres; f) corte transversal con fruto maduro; g) fruto; i) semilla. (Dehgan 1984).	15
<b>Figura 3.</b> Esquema PCR-ISSR, basado en el esquema de Pradeep & Sarla 2002, se muestran un primer no anclado a la secuencia y dos primers anclados en la región 5' y 3' respectivamente, con dos nucleótidos diferentes al motivo repetido, lo cual origina productos de diferente tamaño.	24
<b>Figura 4.</b> Interpretación de bandas y construcción de una matriz binaria simple.	32
<b>Figura 5.</b> Control de calidad de ADN genómico mediante la técnica de electroforesis.	35
<b>Figura 6.</b> Análisis de presencia y ausencia de bandas.	37
<b>Figura 7.</b> Gráfico de los valores del PIC	39
<b>Figura 8.</b> Fenograma generado por el agrupamiento UGPMA; donde los individuos se disponen geoméricamente según su valor de similitud	41
<b>Figura 9.</b> Consistencia de los datos del fenograma representados en la correlación de matrices, de los valores coféneticos y los datos de similitud.	42
<b>Figura 10.</b> Análisis de Coordenadas Principales, coeficiente Simple Matching. Con el fin de correlacionar los individuos estudiados en relación a su entorno, genotipos más afines se agrupan entre sí.	43

# ÍNDICE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> <i>Mix PCR-ISSR.</i>	31
<b>Tabla 2.</b> <i>Lista de Primer ISSR que amplificaron.</i>	36
<b>Tabla 3.</b> <i>Georreferencia de los individuos colectados en las regiones de Ucayalí y San Martín</i>	58
<b>Tabla 4.</b> <i>Concentración y calidad de ADN de las mejores muestras de J, curcas</i>	61
<b>Tabla 5.</b> <i>Matriz binaria, base de datos para los análisis de índices de polimorfismos.</i>	62
<b>Tabla 6.</b> <i>Recuento de Loci polimórficos Monomórficos, porcentajes descriptivos por Locus</i>	64
<b>Tabla 7.</b> <i>Valores descriptivos de la diversidad genética por cada locus de J. curcas.</i>	68

## RESUMEN.

*Jatropha curcas*, planta de porte arbustivo perteneciente al grupo de las euforbiáceas, es originaria de Centroamérica. Actualmente se encuentra ampliamente distribuida en los trópicos, considerada como un cultivo promisorio para la producción de biodiesel.

La presente investigación analiza la diversidad genética de 30 individuos de *J. curcas* provenientes de la selva peruana de las regiones de Ucayali y San Martín. Mediante el marcador molecular ISSR, del cual se obtuvo 152 loci, amplificados, de los cuales 51 resultaron ser polimórficos, con índice de loci polimórficos de 34% y un coeficiente de similaridad (Coeficiente Simple Matching) de 0.78. Del análisis UPGMA, se obtuvieron dos cluster diferenciados y posiblemente el segundo cluster puede pertenecer un grupo totalmente diferente del resto de los genotipos estudiados. El resultado obtenido en esta investigación es un aporte para futuras colecciones o bancos de germoplasmas que nos permita conservar la *Jatropha* como recurso genético.

## ABSTRACT

*Jatropha curcas*, a shrub plant group belonging to the Euphorbiaceae, is native to Central America. Today it is widely distributed in the tropics, considered as a promising crop for producing biodiesel.

This study examines the genetic diversity of 30 individuals of *J. curcas* from the Peruvian jungle regions of Ucayali and San Martín. Using ISSR molecular markers, 152 loci were obtained, of which 51 were found to be polymorphic loci with a polymorphic rate of 34% and a coefficient of similarity (Simple Matching Coefficient) of 0.78. The UPGMA analysis indicated two distinct clusters and possibly a second cluster may belong to a totally different group from the rest of the genotypes under study. The result obtained in this study is a contribution for future germplasm collections which will allow us to keep *Jatropha* as a genetic resource.

# I. INTRODUCCION

En los últimos años, muchos países han buscado nuevas alternativas como fuente de energía de bajo costo; que sean además ecológicas y renovables como los biodiesel, que se obtienen de aceites vegetales o grasas de animales mediante procesos de esterificación y transesterificación; que perfectamente pueden sustituir al petróleo, debido a sus características fisicoquímicas similares. En este enfoque destacan las plantas oleaginosas para la producción de biocarburantes de excelente calidad; entre las cuales se encuentra *Jatropha curcas* o “Piñón blanco”, como comúnmente se le conoce.

Esta planta de porte arbóreo, perteneciente al grupo de las euforbiáceas, es originaria de Centroamérica, crece de manera silvestre en climas tropicales, subtropicales y desérticos, puede llegar a medir de 3 a 5 metros (Makkar, *et al.*1997). Su distribución es bastante amplia, se encuentra en el sudoeste de Asia, India, África y Sudamérica, y en nuestro país se ha identificado accesiones de *Jatropha curcas* en las regiones de San Martín, Ucayali y en la costa norte del Perú (Makkar, *et al.*1997).

*Jatropha curcas* posee gran capacidad de adaptación en condiciones extremas, puede crecer en suelos pobres de baja productividad (Heller, 1996) y sus semillas tienen un alto contenido de aceite en un margen entre 30 y 40 %, que puede ser utilizado sólo para elaboración de biodiesel; debido a que sus semillas son tóxicas; por lo tanto, su aceite no es comestible y no compite con otras plantas de uso alimenticio para la elaboración de biocarburantes. Países como India y Brasil vienen desarrollando programas de cultivos de *J. curcas*, con la finalidad de combatir la deforestación y erosión de tierras marginales, y sobre todo para promover el desarrollo económico de zonas rurales, mediante el

desarrollo de la industria de biodiesel. En nuestro país también se evalúa proyectos de cultivos energéticos; para lograr fines similares ya mencionados; en base a cultivos de *J. curcas*. El Instituto Nacional de Innovación Agraria "INIA" (2007), convocó el lanzamiento de perfiles de proyectos, en *J. curcas* en cooperación con las universidades e instituciones; dedicadas al desarrollo rural agrícola en nuestro país, como: El estudio germoplasmas promisorios de "Piñón blanco"; La evaluación de su comportamiento agronómico y su contenido de aceite; y La evaluación de cuatro ecotipos de Piñón blanco, para la producción de biocombustibles. Sin embargo, estos proyectos no contemplan, estudios en base a la caracterización molecular, para identificar marcadores genéticos asociados a la calidad del aceite del "Piñón blanco", y así seleccionar genotipos específicos, lo cual es importante para perfeccionar su cultivo y su transformación industrial.

Por las razones expuestas es necesario caracterizar la variabilidad genética del *J. curcas*, la cual se refiere a la variación hereditaria de los individuos y poblaciones, y puede ser directamente estudiada a través de los marcadores moleculares; bajo esta premisa se planteó la hipótesis de que existe diversidad genética dentro de la población de estudio, en la cual se puede distinguir variedades promisorias con el objetivo de evaluar la potencialidad de los marcadores moleculares; para determinar el grado de similaridad genética entre los individuos e investigar si los agrupamientos generados se relacionan directamente con caracteres morfológicos y agronómicos recopilados de las accesiones estudiadas, con las cuales se puede establecer relaciones intrapoblacionales e interpoblacionales entre los 30 individuos agrupados según origen geográfico.

## II. ANTECEDENTES

### 2.1. Hábitat y Centro de Origen.

*Jatropha curcas* es una planta oleaginosa, que ha cobrado gran interés debido que es considerada materia prima para la producción de biodiesel. Pertenece a la familia de las Euforbeaceas, de porte arbóreo con corteza blanco grisácea y exuda un látex translúcido; nativa de México (Aponte; 1978), crece naturalmente en las regiones costeras de este país. Se reportan hasta 170 especies distribuidas en Centroamérica; pero también se ha distribuido ampliamente en Asia, África y Surdamérica, donde es cultivada como cobertura vegetal y para la producción de biodiesel, (Heller; 1996).



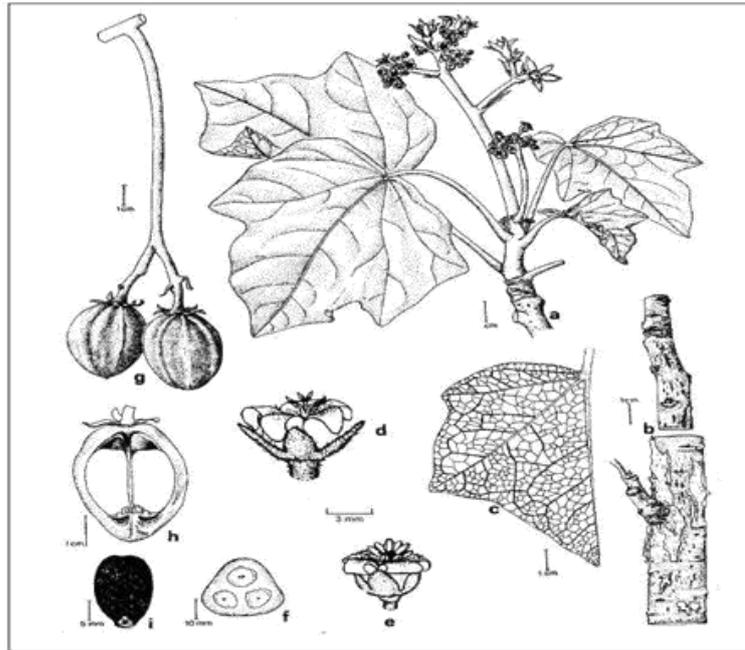
**Figura 1.** Distribución geográfica de *J. curcas* a nivel mundial (Münch 1986).

En nuestro país fue introducida al parecer en tiempos precolombinos; de las 8 especies que crecen aquí sólo dos son endémicas; *J. humboldtiana* y *J. macrantha* (León. *et al.* 2006).

Existen numerosos estudios acerca de sus propiedades. Esta planta puede crecer en condiciones climatológicas extremas, en suelos de escasos nutrientes, arenosos o salinos inclusive puede soportar largos periodos de sequías desprendiéndose de sus hojas para reducir la evapotranspiración; puede llegar a medir de 3 a 5 metros de altura y tener una vida productiva de al menos 50 años (Jones N, Miller J. H. 1992; Arjun B. *et al.* 2008)

## **2.2. Descripción Botánica.**

Planta perenne cuyo ciclo reproductivo puede durar de 45 a 50 años, de crecimiento rápido, puede alcanzar una altura hasta 5 metros en excelente condiciones, de corteza delgada, color verde amarillo, de hojas simples y alternas con lamina palminervada de 7 a 32cm de largo, por lo general está dividida tres a cinco lóbulos, posee flores masculinas y femeninas, con cáliz de cinco sépalos y corola acampanada con cinco lóbulos extendidos, la flor masculina tiene 10 estambres, y la flor femenina cuenta con ovarios de 3 celdas con estilos y estigmas cortos bifurcados. Su fruto son cápsulas drupáceas ovoides de 2.5 a 4cm de largo y de 2.6 a 2.9 de ancho, con tres semillas oleaginosas, que contienen ácidos grasos (palmítico, oleico, linóleo, esteárico) y cada una de ellas llega a pesar en promedio hasta 0.75g, sus semillas contienen una cantidad considerable de aceite hasta 40%, que puede ser perfectamente aprovechado para la elaboración de biodiesel (Keith, O. *et al.*2000; Pramanik, K. *et al* 2003; Shweta. *et al.* 2005; Kumar T. *et al.* 2007)



**Figura 2.** Morfología de *Jatropha curcas* a) ramas con flores; b) corteza; c) venas de la hoja; d) flores con pistilos; e) flor con estambres; f) corte transversal con fruto maduro; g) fruto; h) semilla. (Dehgan 1984).

### 2.3. Taxonomía y Nomenclatura.

El género *Jatropha* pertenece a la familia *euphorbiaceae*, la cual contiene 170 especies conocidas aproximadamente (Dehgan & Webster 1979), agrupa plantas de porte arbustivo, las cuales presenta diversa variación morfológica, además presenta flores de color verde a blanquecino, con pelos urticantes tanto en sus flores, hojas, tallos y su fruto es característico por ser oleaginosa, sus semillas contienen en promedio entre 35 a 38% de aceite (Font, 2003). Su clasificación de acuerdo a la cladística su clasificación actual es la siguiente:

Reino	:	Plantae
Subreino	:	Tracheobionta
División	:	Magnoliophyta
Clase	:	Magnoliopsida
Subclase	:	Rosidae
Orden	:	Euphorbiales

Familia : Euphorbiaceae  
Género : Jatropha  
Especie : *Jatropha curcas*

## **2.4. Usos y Potencialidades.**

En muchos países de América y África el cultivo de *Jatropha c.* es utilizado como cerco vivo para la protección de otros cultivos, asimismo es una gran alternativa para la recuperación de suelos erosionados, o para aquellas tierras no aptas para cultivos en general (Heller 1996). Tanto como sus hojas y látex se usan en la medicina tradicional, su aceite es utilizado para fabricar jabón o lubricantes.

## **2.5. Toxicidad**

La semilla de esta planta es tóxica debido a que contiene curcina, alcaloide que puede causar efectos mortales como: vómitos, diarrea acompañadas de dolores abdominales, e hipotensión arterial, además de una sensación de malestar, debilidad y trastornos respiratorios, pudiendo ocasionar la muerte, debido a todas estas razones no se recomienda su uso para el consumo alimento, aunque su semilla debidamente tostada pierde toxicidad (Anon, 2001).

## **2.6. Recurso Genético de J. curcas**

Todas las ventajas naturales descritas en este texto, le permiten a *J. curcas* o “el Piñon blanco” ser una candidata para el desarrollo de cultivos bioenergéticos. Debido a ello, muchos países invierten en programas para el desarrollo y cultivo de *J. curcas* pero, el desarrollo de esta industria necesita bases científicas que les permita consolidar su éxito como cultivo bioenergético.

Estos programas generalmente se basan en la caracterización morfológica de accesiones de *J. curcas* (Freitas *et al.*2007); su biodiversidad es caracterizada tomando en cuenta caracteres como; la altura media de las plantas, el color de las hojas adultas, el diámetro medio del cauloide, así como el tipo de ramificación. Su germoplasma también es caracterizado, fundamentalmente tomando en cuenta características de alta y de baja heredabilidad; medidas a través del fenotipo (Freitas *et al.*2007). Este tipo de caracterización tiene sus limitantes como; la influencia del medio ambiente, el tiempo requerido para coleccionar los datos y el reducido número de genes involucrados en este proceso (Becerra y Paredes; 2000). De esta manera, se crean bancos de datos para la selección de su semilla, a fin de llevar a cabo técnicas de transplante de esquejes e injertos (Severino *et al.*, 2006) y de micropropagación (Wei *et al.* 2004; Sujatha. M *et al.* 2005), donde se analizan la diferenciación de brotes adventicios a través de la formación del callo; generando así un nuevo individuo idéntico al original, como resultado de esta multiplicación vegetativa. Sin embargo, esto no asegura el éxito de los programas de cultivo, debido a que los clones no tienen variabilidad genética, además, la semilla de *J. curcas spp* es heterocigoto; lo que afecta su crecimiento y calidad de semilla siendo el porcentaje de contenido de aceite muy variable (Jha, T. *et al.* 2007).

No obstante los estudios a nivel molecular pueden validar la información proporcionada por la taxonomía morfológica, analizando de manera veraz la diversidad genética de poblaciones de *J. curcas* a través de los marcadores moleculares en base de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR); que poseen una mayor sensibilidad para detectar cambios en el genotipo de los individuos. Estas herramientas nos permiten, diferenciar fragmentos específicos de ADN, siendo posible detectar, grupos de genes relacionados al control de caracteres

cuantitativos; para construir mapas de genomas y determinar relaciones filogenéticas (Ferreira y Grattapaglia 1998).

## **2.7. Marcadores Moleculares.**

Los Marcadores moleculares se definen como cualquier diferencia fenotípica dentro de una población; la cual es controlada genéticamente. Se puede considerar como marcador molecular a cualquier molecular orgánica o inorgánica que represente una característica de un organismo, y además debe tener ciertas propiedades como; tamaño o peso molecular conocido, que sirva para monitorear o calibrar la separación de las mismas utilizando técnicas de electroforesis o cromatografía (SIDTA, 1999). Los primeros marcadores moleculares conocidos fueron la isoenzimas (Morgante, 1993) las cuales son variantes de una misma enzima que comparten un sustrato en común pero difieren en su peso molecular. Las isoenzimas incluyen todas las sub unidades de polímeros de diferentes loci o por diferentes alelos en un mismo locus, Diferentes individuos en una misma población pueden tener diferentes formas moleculares de la misma proteína. Esa variabilidad es la clave de la caracterización molecular de la estructura de las proteínases producida por factores genéticos o epigenéticos (Haines 1994). Aunque su uso en la actualidad es muy limitado por no poseer marcadores que puedan cubrir todo un genoma y la falta de colorantes enzimáticos disponibles que nos permita diferenciar patrones diferentes en ensayos de cromatografía. Las Isoenzimas han sido ampliamente usadas en estudios de mejoramiento de poblaciones naturales y su relación al estrés biótico ya abiótico (Haines 1994).

No obstante, con el correr de los años se desarrollaron técnicas muy variadas de distintos marcadores moleculares entre los que se encuentran los RFLPs (Restriction Fragment Length Polymorphisms) (Ferreira y Grattapaglia, 1998), que reconocen secuencias específicas de nucleótidos

del ADN por medio de enzimas de restricción; que cortan estos fragmentos con el objetivo de obtener alelos de carácter codominante en un individuo. Esta técnica se ha empleado en plantas oleaginosas de la familia Brassicaceae (de las cuales se obtiene el aceite comercial comestible) para detectar polimorfismos intra-poblacionales e inter-poblacionales entre especies *Brassica oleracea* y *Arabidopsis thaliana*, relacionando homologías entre los cromosomas de ambas poblaciones en relación a sus fragmentos de restricción; determinando así las distancias genéticas para la construcción de mapas geonómicos (Pradeep, *et al.* 2002).

Actualmente gracias al avance de la técnica de la técnica de Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se desarrollaron varios tipos de marcadores moleculares, los cuales permitieron conocer los niveles de variación genética de diferentes poblaciones de estudio. Aunque el manejo y elección de los marcadores moleculares depende muchas veces de diferentes aspectos como; la capacidad de amplificar diferentes genomas, su nivel de reproducibilidad, grado de polimorfismo que se pueda detectar, así como, las especificidades que se puedan encontrar a nivel del locus, para elegir un buen marcador molecular debe considerarse ciertos aspectos como el nivel de laboriosidad de la técnica, la capacidad de inversión financiera de acuerdo al estudio que se quiera realizar.

Los marcadores deben ser capaces de detectar diferencias pequeñas en la secuencia de ADN de los individuos, identificando polimorfismos entre los individuos, así como cambios en la secuencia del genoma. Entre los marcadores moleculares más conocidos, basados en la técnica de PCR, se encuentran los RAPD (Random Amplified Polymorphisms DNA, que amplifica segmentos de ADN utilizando primers de manera arbitraria para detectar polimorfismos en el ADN genómico), de esta manera se obtienen varias secuencias de nucleótidos de diferente tamaño siendo posible separarlas por medio de la electroforesis; a fin de observar diferentes

patrones de bandas; sin embargo, una de las desventajas de este marcador es que en ocasiones no genera suficientes polimorfismos entre variedades de especies (Williams *et al.*, 1990).

Así mismo el marcador molecular AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism PCR) es ampliamente empleado en estudios de caracterización genética, es considerado altamente eficiente para detectar una alta variedad de polimorfismos en gran número de loci, su análisis es mucho más laborioso y complicado pues requiere de una mayor cantidad de ADN; para su procedimiento se emplean dos enzimas de digestión muy específicas que cortan segmentos de ADN reconocidos por ellas mismas, además se debe añadir adaptadores que ligan los segmentos formados los cuales serán reconocidos por los primers para amplificados mediante la técnica de PCR (Karp *et al.* 1997).

Otro marcador molecular muy recomendado es SSR (simple sequence repeat) conocido también como microsatélite, conformado por un motivo repetido entre dos regiones flanqueantes, que deben ser altamente conservadas, es decir para considerar un microsatélites de interés, toda la variación del polimorfismo debe encontrarse en el motivo repetido, así los fragmentos reproducidos o amplificados de ADN son locus con características cuantitativas (QTL) los cuales se clonan y se secuencian para el estudio análisis de poblaciones. Los SSR son altamente reproducibles y fáciles de usar para estudios de diversidad genética en poblaciones, con el fin de detectar tasas de mutaciones y realizar mapeos genéticos o moleculares en estudios de filogenia. No obstante el desarrollo de estos microsatelites es más costoso puesto que requiere de un secuenciador de capilares para la detección de las bandas amplificadas (Litt, M. y J. A. Luty. 1989; Zhang *et al.*, 2005; Guiltinan, 2007).

La presente investigación utilizó el marcador ISSR (Inter - Simple Sequence Repeats) conocido en español como: "Secuencia entre Repeticiones Simples" para el estudio de Caracterización de la

variabilidad genética del *J. curcas*, debido que presenta ventajas en relación a otros marcadores moleculares; no necesita conocimiento previo de la secuencia de ADN en estudio; las cantidades de ADN que se emplean son relativamente bajas; y se obtienen numerosos polimorfismos observables de tres a cuatro veces mas que los RAPD; y no hay necesidad de utilizar sondas radiactivas para su estudio, como es el caso de los RFLP (Volgel y Scolnik 1997).

## **2.8. Fundamente de la Técnica de los ISSR's.**

Esta técnica se basa en la metodología del PCR, donde se emplea un solo primer de 16 a 25 bp de largo, que amplifica el segmento de ADN de la cadena molde, que se encuentra entre dos regiones microsatélites orientadas en dirección opuesta; los primers diseñados para los microsatélites se unen a secuencias repetidas de di y trinucleótidos, evitando de esta manera unirse a monucleótidos presentes en el ADN del cloroplasto. La amplificación del fragmento de ADN nuclear ocurre únicamente bajo una temperatura específica de alineamiento y cuando la distancia entre los primer o partidores sea de 1000 a 1200 bp, por otro lado la amplificación no ocurrirá si existe divergencia entre los sitios de unión lo que indicaría la ausencia de locus en el genoma, así mismo, se determina un locus en el genoma, donde las bases se aparearan en los extremos o flancos de las secuencias repetitivas, obteniéndose productos de diferente tamaño y peso molecular; que son observados mediante la técnica de electroforesis en geles de alta resolución que permiten detectar diferencias de 2, 3 o 4 nucleótidos; que se interpretan como un patrón característico de polimorfismo únicos y particulares de los individuos de una misma población (Zietkiewicz. E.; A. Rafalski & D. Labuda. 1994; Pradeep R, Sarla N. & Siddiq E.; 2002)

## **2.9. Capacidad de detección de polimorfismos a nivel del genoma.**

Las regiones microsatélites se extienden a lo largo del genoma, son secuencias cortas de nucleótidos los cuales se heredan de forma dominante y poseen un elevado grado de variabilidad genética dentro de las poblaciones, por esta razón, es útil identificar niveles de polimorfismo mediante su amplificación por PCR (Weber & May, 1989). Bajo este contexto los ISSR's son marcadores que nos permiten observar niveles de variación en ciertas regiones del genoma, formados por secuencias particulares que consisten en repeticiones o tandems como (CT)<sub>n</sub> ó (CA)<sub>n</sub> llamadas microsatélites; que son características de una población sujeto de estudio diferenciándola de otras con las que no se ha cruzado (Morgante y Olivieri, 1993).

Pueden ser penta-, tetra-, tri- y dinucleótidos ubicados entre secuencias no repetitivas. La longitud de estas secuencias puede ser variable entre los individuos debido a las mutaciones que experimenta el ADN durante su replicación en la meiosis (Zietkiewicz *et al.*, 1994) como consecuencia las cadenas resultantes pueden entonces presentar menos o más unidades de repetición (o pares de bases) que las cadenas parentales. (Zietkiewicz *et al.*, 1994; Pradeep. *et al.* 2002)

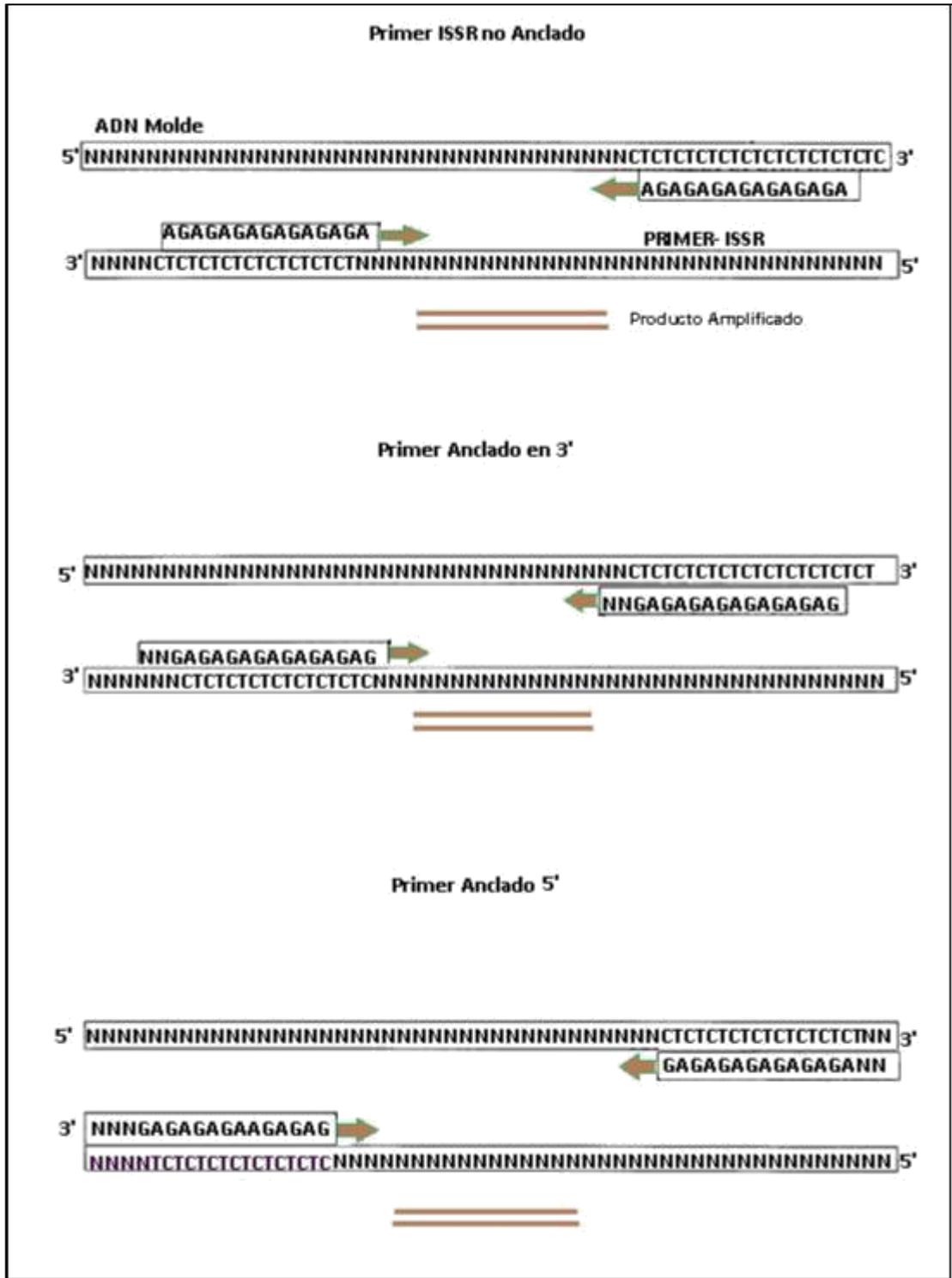
## **2.10. Usos y Aplicaciones.**

Los ISSR's tienen múltiples aplicaciones. No sólo son utilizados para caracterizar la variabilidad genética; son empleados también para diseñar cartografía de genomas para estudios filogenéticos y evolutivos debido a que las repeticiones o tandems son regiones que tienden a agruparse en los centrómeros y telómeros de los cromosomas en todos los organismos a nivel de especie y que perduran a través del tiempo, inclusive a nivel de taxa mayores (Zietkiewicz *et al.* 1994).

Los ISSR's se consideran marcadores moleculares dominantes, donde la presencia de una banda amplificada indica si el carácter es homocigoto dominante o heterocigoto, por el contrario su ausencia es considerada como un carácter homocigoto recesivo (Karp et.al., 1997).

Este marcador es bastante utilizado en programas de mejoramiento genético vegetal. Un ejemplo claro de su aplicación, fue el estudio que se realizó en *Olea europaea* L para la identificación de polimorfismos, entre cultivares de olivo introducidos y cultivares de olivo ancestrales (Cipriani, G. et al 2002). De los doce cultivos examinados los investigadores lograron encontrar polimorfismos marcados entre las variantes de cultivos de olivo, además dos variedades que parecían idénticas no lo eran, pues mostraron diferentes patrones de bandas, pero también se encontró regiones conservadas entre los cultivares de olivo ancestral y los introducidos. Con estos datos se logró caracterizar genéticamente las variedades de olivo así como la construcción del mapa de su genoma.

Otra investigación similar donde se aplicaron los ISSR's fue el estudio de la variabilidad genética en las poblaciones de *Brassica nigra* (la mostaza negra). Su objetivo fue determinar el grado de variabilidad genética de acuerdo a su distribución geográfica. Westman, A.L y Kresovich, S (1999) evaluaron accesiones de África del Norte, Europa, y América del Norte. Lograron detectar similitudes polimórficas entre las variantes de Europa y América del Norte, pero encontraron grandes diferencias con las variantes de origen africano frente a las variantes Norteamericanas. Demostrando así, una diversificación genética de acuerdo a su distribución geográfica y la histórica relación comercial entre continentes.



**Figura 3.** Esquema PCR-ISSR, basado en el esquema de Pradeep & Sarla 2002, se muestran un primer no anclado a la secuencia y dos primers anclados en la región 5' y 3' respectivamente, con dos nucleótidos diferentes al motivo repetido, lo cual origina productos de diferente tamaño.

En *J. curcas* la aplicación de marcadores moleculares para su estudio no ha sido la excepción. Sathaiah y Reddy (1985) utilizaron isoenzimas para confirmar la relación genética de los miembros del género *Jatropha* y Ricinos, también se ha empleado el uso de RADP para determinar el grado de hibridación de diferentes accesiones de *J. curcas* (Sujatha y Prabakaran; 2003). Basha. SD y Sujatha. M (2007), estudiaron la variabilidad intra-poblacional del *Jatropha curcas*, mediante el uso de marcadores RAPDs convertidos a marcadores SCAR's (sequence characterized amplified regions) y los ISSR's , identificaron la existencia de polimorfismos y variación genética de las 42 muestras examinadas de la especie introducida en la India, encontrando además diferencias polimórficas significativas entre el fenotipo de origen "Mexicano con el Indio".

Finalmente la elección de ISSR marcador molecular para obtención de los microsatélites de las accesiones de *J. curca* de las regiones de San Martín y Ucayali en nuestro país; se basa en las siguientes ventajas: poseen un mayor nivel de reproductividad que los marcadores RAPD's, además no se necesita conocimiento previo de la secuencia de ADN y a la vez puede identificar regiones únicas del genoma en diferentes loci lo cual nos permite identificar diferentes niveles de variación polimórfica a nivel de población, y su costo es mucho menor en cuanto a los marcadores AFLP y SSR, aunque cuenta con la desventaja que no es posible asignar bandas ausentes a un mismo tipo de homología genética, no obstante, para nuestro investigación se pudo estudiar relaciones genéticas como la variabilidad genética intra -poblacional e inter-poblacional entre poblaciones estudiadas, además de obtener una base de datos que pueda ser utilizada para futuros estudios de investigación de mejoras genéticas para su manejo y conservación.

## **2.11. Aplicación de la Fenética o Taxonomía Numérica.**

La Fenética o Taxonomía Numérica se refiere a un sistema de clasificación filogenética mediante el cual se puede cuantificar los niveles de similitud de caracteres entre diferentes organismos, para así eliminar toda apreciación cualitativa o subjetiva.

Esta metodología se basa en la tabulación matemática de muchos caracteres sometidos a evaluación por diferentes algoritmos matemáticos, reflejados en programas informáticos. Fue desarrollada y popularizada por Sneath y Sokal (1973) le atribuyen dar igual peso a todos los caracteres presentes en un organismo ya sean morfológicas, fisiológicos o moleculares etc; de esta manera se obtienen diferentes índices de similitud o disimilitud, los cuales se ordenan en sus respectivos grupos taxonómicos, sin embargo la fenética no toma en cuenta la historia evolutiva de los grupos analizados, en este aspecto la cladística ha superado notablemente a la fenética, en el campo de la historia evolutiva de los diferentes organismos analizados, no obstante, lo cladistas aun utilizan métodos fenéticos para elaborar dendogramas no enraizados llamados fenogramas, que establecen relaciones de parentesco y similitud agrupándolos en OTU (unidades taxonómicas operacionales) a fin de obtener una aproximación de la filogenia de los grupo analizados, esto hace posible evaluar múltiples variables y su interpretación en gráficos más simples, que nos permitan discernir los niveles de jerarquía de los grupos estudiados (Llorente, J. 1989).

## **2.12. Estudio de variabilidad poblacional.**

Mediante el uso de marcadores moleculares se pueden estimar grados, patrones y diferencias genéticas a nivel de poblaciones, a partir de la frecuencia que se manifiesten diferentes variantes (alelos) que se

agrupan en OTU, para medir las distancias genéticas y establecer relaciones filogenéticas, bajo este concepto los fragmentos de ADN amplificados por marcadores moleculares son visualizados en geles de corrida a los cuales se les denomina bandas, la presencia o ausencia de ellas son genotipos que pueden ser compartidos dentro de una población. Para su respectivo análisis se les otorga un valor de 1 y 0 dentro de una matriz binaria correspondiente a su presencia o ausencia; estos valores determinan un “*cluster*” o ramas comunes (Sneath y Sokal, 1973) con la finalidad de estimar la variabilidad y diversidad genética estableciéndola como patrones fenotípicos dentro de la población de estudio (Excoffier *et al.*, 2005).

### **2.13. Análisis de la variabilidad genética y poblacional.**

Este análisis comprende la caracterización y cuantificación de la diversidad genética y su relación entre y dentro de las poblaciones, bajo este contexto los datos moleculares se manejan como datos binarios, una vez obtenidos se puede calcular el polimorfismo o la tasa de polimorfismo ( $P_j$ ), la cual proporciona el criterio para determinar si un gen presenta variación. Generalmente un gen se define como polimórfico si la frecuencia de uno de sus alelos es menor o igual a 0.95 ó 0.99, la medida es arbitraria pero, sirve para identificar aquellos genes que presentan mayor variación alelica (Cavalli-Sforza, L. L. y W. F. Bodmer. 1981). Su fórmula es la siguiente:  $P_j = q \leq 0.95$ , donde representa  $P_j$  = tasa de polimorfismo y  $q$  la frecuencia alelica. (Tabla 7, pag. 55)

La estimación de loci polimórficos se realiza tomando en cuenta el número de loci polimórficos dividido por el total de loci (monomórficos y polimórficos a su vez) [ $P = np_j / n_{total}$ ] lo cual expresa el porcentaje de loci variables que se encuentran dentro de una población, finalmente nuestro análisis concluye con la estimación de la heterocigocidad promedio

observada ( $H_i$ ) que es probabilidad de que un locus presente cualquier par de alelos escogidos aleatoriamente sean diferentes entre sí; lo que nos da un índice aproximado de la variabilidad genética que existe dentro de la población de estudio (Rozas, J. y R. Rozas. 1995) (Tabla 7, pág. 55)

## III. MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.1. Obtención de la muestra.

La población de estudio son 30 muestras de *J. curcas* procedentes de los departamentos de San Martín y Ucayali, colectadas por el museo de Historia Natural de San Marcos por el marco de cooperación del proyecto 2007-00513-AGINCAGRO/FDSE.

Las muestras de tejido foliar fueron colectadas de acuerdo al método de inventario convencional (Cerrate, 1969). Cada ejemplar fue colocado en bolsas ziploc con silicagel (que absorbe la humedad, para una mejor deshidratación de la muestra) fue debidamente rotulado, anotando datos de localidad; coordenadas geográficas, nombre del colector y formas de crecimiento.

### 3.2. Extracción del ADN.

El protocolo inició colocando tejido vegetal pulverizado en nitrógeno líquido en un microtubo de 2ml mas 800 µl del buffer de CTAB (2% CTAB, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA pH 8, 100mM Tris HCl pH 8, 0.2% Mercaptoetanol y Agua ultra pura). Incubándose por 45 minutos. Luego Agregó 750 µl de cloroformo:isoamilico (24:1) Agitándose ligeramente hasta que se homogenizo el contenido el cual fue centrifugado a 14,000 rpm por 5 minutos. Posteriormente el sobrenadante, se traspasa a otro tubo limpio donde se le añadió 75 µl de CTAB 10X (65°C) más 650 µl de cloroformo:isoamilico (24:1) y se centrifugo a 14,000 rpm x 5 minutos.

El sobrenadante se transfirió a un tubo limpio de 1.5ml, se le agregó un volumen igual de isopropanol frio. Se mezclo por inversión y luego se colocó la mezcla a - 20 C° por 40 minutos para precipitar el DNA.

Finalmente se centrifugó a 14000 rpm por 20 minutos para después desechar la fase acuosa. Se enjuagó el pellet con etanol 80% y se volvió a centrifugar a la misma velocidad por 20 minutos. Se dejó secar al aire y se resuspendió en una solución de TE (Tris y EDTA) en 75 µl, por último se agregó RNAsa tipo A en una concentración de 10 mg/µl durante una hora a 37 °C.

### **3.3. Pureza y concentración de ADN.**

La pureza de ADN se midió en el biofotómetro Nanodrop que nos otorgó directamente la tasa de absorbancia [A260/A280] rango en el que se lee la presencia de ácidos nucleídos, los valores de su pureza se estableció dentro de los parámetros de 1,8 a 2,0 lo que indica que se encuentra libre de proteínas o de solventes orgánicos. En cuanto a la concentración también fue calculada directamente en ng/ µl en base a la fórmula:  $50 \times A260 \times \text{Factor de dilución}$ , las muestras se visualizaron en geles de agarosa con el fin de corroborar su calidad ya si dar paso al análisis ISSR –PCR (Rickwood y Hames ,1990)

### **3.4. Análisis ISSR-PCR.**

La técnica de los ISSR's es utilizada frecuentemente para detectar polimorfismos (variación interpoblacional, intrapoblacional o individual). Mediante esta técnica, se evaluó el establecimiento de relaciones genéticas de los individuos de la población de estudio. Para el análisis con los ISSR's, se utilizaron los mismos iniciadores o primers comerciales utilizados por Basha y Sujatha (2007). Las amplificaciones de PCR se llevaron acabo utilizando el Kit PCR Master Mix de Fermentas. Los volúmenes de la reacción se muestran en la siguiente tabla:

**Tabla 1.** Mix PCR-ISSR.

Reactivos	[Inicial]	[Final]	Vol. ul
PCR			
Buffer	5x	1x	2 ul
dNTP's	2.5 mM	200 uM	0.8 ul
Primer (ISSR)	10 Um	0.5 uM	0.5 ul
MgCl <sub>2</sub>	25mM	2.5 mM	0.8 ul
Taq	5U/ul	0.3U/Rx	0.6ul
NFW			3,84
DNA		10ng/ul	2
Total			10

Los ciclos de amplificación son los siguientes:

- Desnaturalización: 94 °C durante 4 min seguido por 35 ciclos a 92 °C por 30s Alineamiento (Ta) o Unión del primer, 1 min.
- Extensión o Elongación de la cadena: 2 min. a 72 °C.
- Elongación Final: 7 min. a 72°C.

### **3.5. Electroforesis.**

Mediante esta técnica se corrieron los productos de PCR a 180 V, en buffer TAE 1X (Tris-acetate-EDTA), se utilizó agarosa al 1.5%. El tamaño de los productos de amplificación se midió con un marcador de peso molecular de 100pb (fermentas). El revelado de los geles se efectuó con bromuro de etidio a 1mg/ml, las fotografías de los mismos se realizaron con el Analizador de Geles y accesorios PCimage (Fotodyne)

### 3.6. Construcción de la Matriz Binaria.

La lectura de los geles se realizó de forma manual, se identificaron patrones de loci, producidos por los marcadores de cada individuo, se trazaron líneas para los carriles y los loci, la intersección entre estos dos puntos representan la ausencia (0) o presencia (1) de la banda de ADN, las fragmentos tenues de ADN se les asigna un valor numérico (9) denominándolos datos perdidos o missing data, todos estos datos son introducidos en un cuadro excel 2003. Así mismo en este cuadro se determinan la frecuencia de cada locus ingresado dividiéndolo por el número total de individuos (los OTU's). Así mismo los valores perdidos con el porcentaje mayor a 10 % son descartados para el análisis (Krebs, 1999). (Tabla 5, pág. 49)

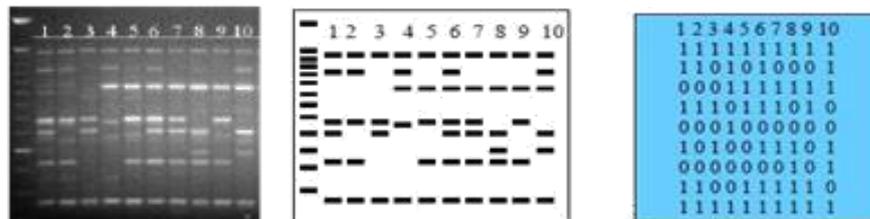


Figura 4. Interpretación de bandas y construcción de una matriz binaria simple.

### 3.7. Coeficiente de similitud.

Los coeficientes de similitud son métodos numéricos utilizados para medir el grado de similaridad entre unidades taxonómica ú OTUs (Operational Taxonomic Units), por lo tanto entre mayor sea su valor cercano a 1, mayor será el parecido entre ellos, en caso contrario si su valor es cercano a cero el parecido será menor, para la conformidad del análisis se tomo en cuenta todos los caracteres observados, esto implica el cálculo de las distancias entre todos los pares de individuos analizados en el estudio (Vicente & Fulton, 2003) En general una medida de similitud se define con una función,  $S(i, j)$  que cumple los siguientes requisitos:

$0 \leq S(i, j) \leq 1$       Valores normalizados

$S(i, i) = 1$       Máxima similitud al comparar el mismo objeto

$S(i, j) = S(j, i)$       Simétrica

Los coeficientes de similitud se aplican en estudios de diversidad genética, para realizar comparaciones entre los marcadores recopilados de las unidades taxonómicas, sobre todo si se trabaja con marcadores moleculares dominantes como los ISSR's, donde se representan la presencia o ausencia de los alelos en dato binarios tomando en cuenta los siguientes valores:

$$(a + d)/(a + b + c + d)$$

a = Número de caracteres donde ambas muestras coinciden en el 1.

b = Número de caracteres donde la primera muestra tiene un 1 y la otra un 0.

c = Número de caracteres donde la primera muestra tiene un 0 y la otra un 1.

d = Número de caracteres donde ambas muestras coinciden en el cero.

Cuando los datos son de presencia y ausencia, es válido considerar que dos muestras son más parecidas a medida que compartan más presencias (unos), y la coincidencia de ceros no aporta información a la similitud, porque puede estar generado por falta de información como; la no amplificación de un fragmento producido por la carencia del sitio de hibridación o como consecuencia de una mutación de punto en dicho sitio (Ruiz De Galarreta, 1993).

Para nuestro análisis se utilizó el "Coeficiente de Concordancia Simple,  $S_{SM}$  (Simple Matching Coefficient) el cual toma en cuenta la proporción de caracteres que comparten dos muestras, considera que la presencia corresponde a loci homocigóticos, heterocigotos y las ausencias podrían corresponder a recesivos homocigóticos. Este coeficiente considera como factor de similitud las dobles ausencias por lo

que su utilización puede conducir a errores si detrás de las dobles ausencias no hay una identidad, lo que ocurre frecuentemente cuando se hacen comparaciones interespecíficas mediante marcadores moleculares dominantes, sin embargo, cuando la probabilidad de la identidad de secuencias en un locus escogido al azar es alta, por ejemplo cuando se hacen comparaciones intraespecíficas, las dobles ausencias se pueden considerar como identidades. (Dalirsefat SB *et al.*; 2009)

### **3.8. Análisis multivariado.**

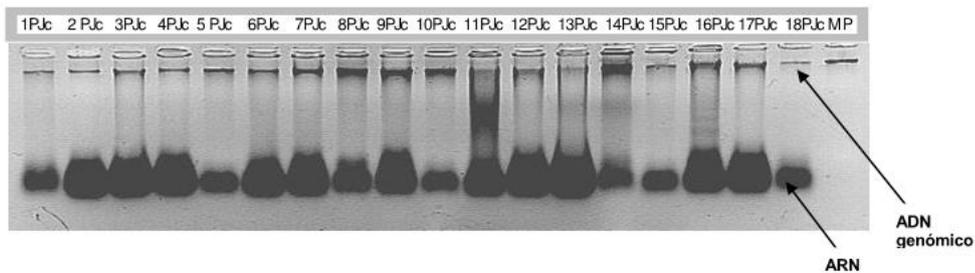
Con la finalidad de evaluar objetivamente la diversidad genética entre los individuos de *J. curcas* estudiados; se hace necesario determinar coeficientes numéricos que den cuenta los grados de proximidad de las unidades taxonómicas y para establecer entre ellas, coeficientes de similitud y de distancia.

Como se mencionó anteriormente, se empleó el coeficiente de similitud  $S_{SM}$  que se define como la proporción de características que coinciden entre dos OTU. Se aplica a variables cualitativas, las cuales solo consideran la presencia o ausencia de un carácter. Usando el programa NTSYSpc v2.1p bioinformática se generó una matriz de similaridad y un fenograma de agrupamiento "UPGMA" (Sokal y Michener, 1958).

## IV. RESULTADOS

### 4.1. Extracción de ADN

El protocolo de extracción de ADN genómico propuesto por Doyle y Doyle (1990), aplicado a las 100 accesiones de *J. curcas* nos proporcionó valores aceptables de calidad y pureza (relación A260/A280) de concentración de ADN ng/ $\mu$ l, de los cuales se seleccionó 30 muestras correspondiéndolas primeras 15 a la región de Ucayali y las siguientes del 16-30 a la región de San Martín; para el análisis de diversidad a través del marcador ISSR (ver, Tabla 4 de datos de concentración de ADN, pág.47)



**Figura 5.** Control de calidad de ADN genómico mediante la técnica de electroforesis.

### 4.2. Elección de los primers.

De los 53 primers evaluados solo se eligieron 27 como marcadores potenciales, que mostraron buena amplificación y resolución de bandas en el gel de agarosa; los cuales se muestran en la siguiente tabla:

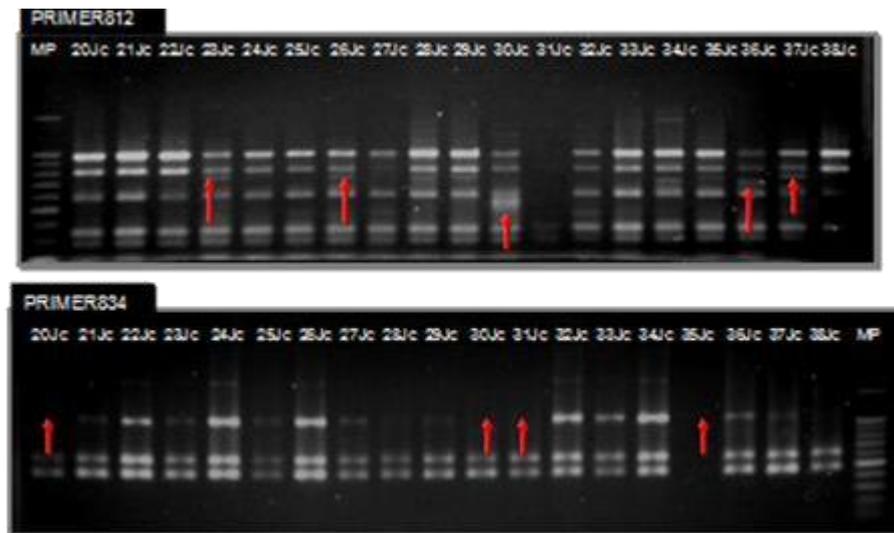
**Tabla 2.** Lista de Primer ISSR que amplificaron.

<b>Muestras</b>	<b>Código</b>	<b>Secuencias</b>	<b>Temperatura</b>
1	UBC807	AGA GAG AGA GAG AGA GT	50.0
2	UBC808	AGA GAG AGA GAG AGA GC	52.0
3	UBC809	AGA GAG AGA GAG AGA GG	52.0
4	UBC810	GAG AGA GAG AGA GAG AT	50.0
5	UBC812	GAG AGA GAG AGA GAG AA	50.0
6	UBC813	CTC TCT CTC TCT CTC TT	50.0
7	UBC816	CAC ACA CAC ACA CAC AT	50.7
8	UBC823	TCT CTC TCT CTC TCT CC	52.0
9	UBC830	TGT GTG TGT GTG TGT GG	43.4
10	UBC834	AGA GAG AGA GAG AGA GYT	45.6
11	UBC835	AGA GAG AGA GAG AGA GYC	47.4
12	UBC836	AGA GAG AGA GAG AGA GYA	48.8
13	UBC840	GAG AGA GAG AGA GAG AYT	47.0
14	UBC841	GAG AGA GAG AGA GAG AYC	47.4
15	UBC842	GAG AGA GAG AGA GAG AYG	49.6
16	UBC856	ACA CAC ACA CAC ACA CYA	57.2
17	UBC861	ACC ACC ACC ACC ACC ACC	60.0
18	UBC862	AGC AGC AGC AGC AGC AGC	60.0
19	UBC868	GAA GAA GAA GAA GAA GAA	48.0
20	UBC873	GAC AGA CAG ACA GAC A	45.1
21	UBC880	GGA GAG GAG AGG AGA	54.0
22	UBC885	BHB GAG AGA GAG AGA GA	51.0
23	UBC886	VDV CTC TCT CTC TCT CT	51.0
24	UBC887	DVD TCT CTC TCT CTC TC	50.1
25	UBC888	BDB CAC ACA CAC ACA CA	51.0
26	UBC889	DBD ACA CAC ACA CAC AC	51.0
27	UBC891	HVH TGT GTG TGT GTG TG	52.2

### **4.3. Análisis con el marcador molecular ISSR.**

Este marcador molecular nos permitió obtener niveles de variación en las regiones de microsatélites que se encuentran dispersas en el genoma de *J. curcas*. La molécula generada a partir de un segmento amplificable de ADN es considerada un locus que marca la distancia entre dos microsatélites; así mismo el nivel de polimorfismo es observable, debido a que las bandas de ISSRs son consideradas marcadores dominantes. La presencia de la banda representa el genotipo dominante (homocigoto o

heterocigoto), mientras que su ausencia representa el genotipo homocigo recesivo, por lo tanto asumimos que existen dos alelos por locus. (Zietkiewicz *et al.*, 1994).



**Figura 6.** Análisis de presencia y ausencia de bandas.

#### **4.4. Análisis Diversidad de la población.**

Para un análisis real de la diversidad se tomó en cuenta el número de alelos detectados y la frecuencia que estos presenten; considerando que una población presenta un alto grado de diversidad es aquella donde la presencia y ausencia de alelos se distribuyan equitativamente, es decir que la población presente un gran número de alelos de frecuencias similares.

Para el análisis se construyó una matriz binaria, para la cuantificación de la presencia y ausencia de bandas, sin tomar en cuenta los valores perdidos o missing data representados por el número 9. Cabe resaltar que para el análisis solo se tomaron en cuenta todos aquellos loci que tenían un índice de presencias ( $p$ ) a partir de 0.05; se calculó presencia ( $p$ ) y

ausencia (q) de los alelos, es decir el número total de individuos evaluados (30) menos el valor de (p) o (q). (Tabla 5, pág.49)

Una vez establecidos estos valores, se calculo la proporción de loci polimórficos que representa el número de loci polimórficos dividido por el número total de loci (polimórficos y monomórficos) mediante el siguiente calculo [ $P = npj/n_{total}$ ] el cual resulto ser el 34 % (Tabla 6, pág 51) de la población de *J. curcas* que se evaluó. (Doolittle; 1987)

Así mismo se calculo la Frecuencia alelica, que representa la presencia de un alelo dado en una población; es decir, la proporción de todos los alelos de ese gen en la población que corresponden específicamente a ese tipo, ya que las diferencias alélicas en un locus único en una población indican variación genética, su cálculo se efectuó de la siguiente manera ( $p/L$ ) y ( $q/L$ ) en base a estos resultados se calculo la frecuencia genotípica la cual representa la frecuencia de un genotipo dado dentro de una población; para nuestro calculo se tomo en cuenta que el marcador molecular ISSR es dominante, por lo tanto, solo pueden observarse dos clases genotípicas: 1,1 + 1,0 y 0,0. Consecuentemente una de las clases homocigóticas se confunde con el heterocigoto, para nuestro análisis se aplico la siguiente formula =  $p^2 + 2pq \rightarrow q^2 = 1$  (Tabla 7, pág.55)

Otro valor que se determino fue la diversidad genética dentro un locus mediante la siguiente fórmula: [ $h_j = 1 - p^2 - q^2$ ].

Los valores calculados para cada locus sirvieron para determinar La diversidad génica promedio ( $H_i$ ) se calcula a partir de la fórmula  $H_i = \sum_j Lh_j/L$ , este valor sirvió para determinar el grado de variabilidad genética en la población el cual fue de 0.4405 valor bastante elevado si tomamos en cuenta que el valor máximo que pude obtener de este índice para un marcador dominante es de 0.5, lo cual indica que la población de *J. curca* evaluado tiene un alto grado de riqueza genética. (Griffiths; 1996)

Así mismo también se estimó el nivel de capacidad de los marcadores moleculares para detectar el grado de polimorfismo de la población en estudio, tomado en cuenta los siguientes parámetros: el poder discriminatorio de los marcadores moleculares, la riqueza de alelos y el *Polymorphic Index Content (PIC)*, (Ghislain *et al.*; 1999)

Dónde:

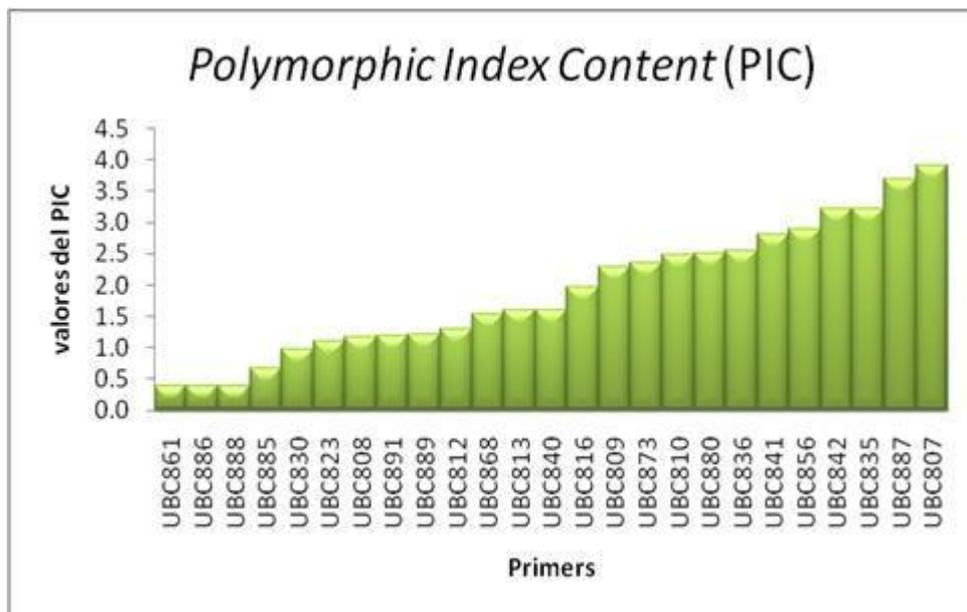
$f_i$ : frecuencia de banda del  $i$ -ésimo alelo.

$p$ : frecuencia de presencia de banda.

$q$ : frecuencia de ausencia de banda.

$$I = - \sum_{i=1}^n p_i^2 \log_2 p_i$$

Finalmente se realizó la suma de todos los valores (PIC), cuyo índice para cada marcador molecular nos indica su capacidad de detectar o reproducir polimorfismos.



**Figura 7.** Gráfico de los valores del PIC

Este índice nos indica que los primers: 807, 887, 835, 847, 856,841 tienen la mayor capacidad de detectar polimorfismo al nivel de genoma de *J. curcas*, son los que aportaron mayor información sobre la distribución de los alelos a nivel de la población.

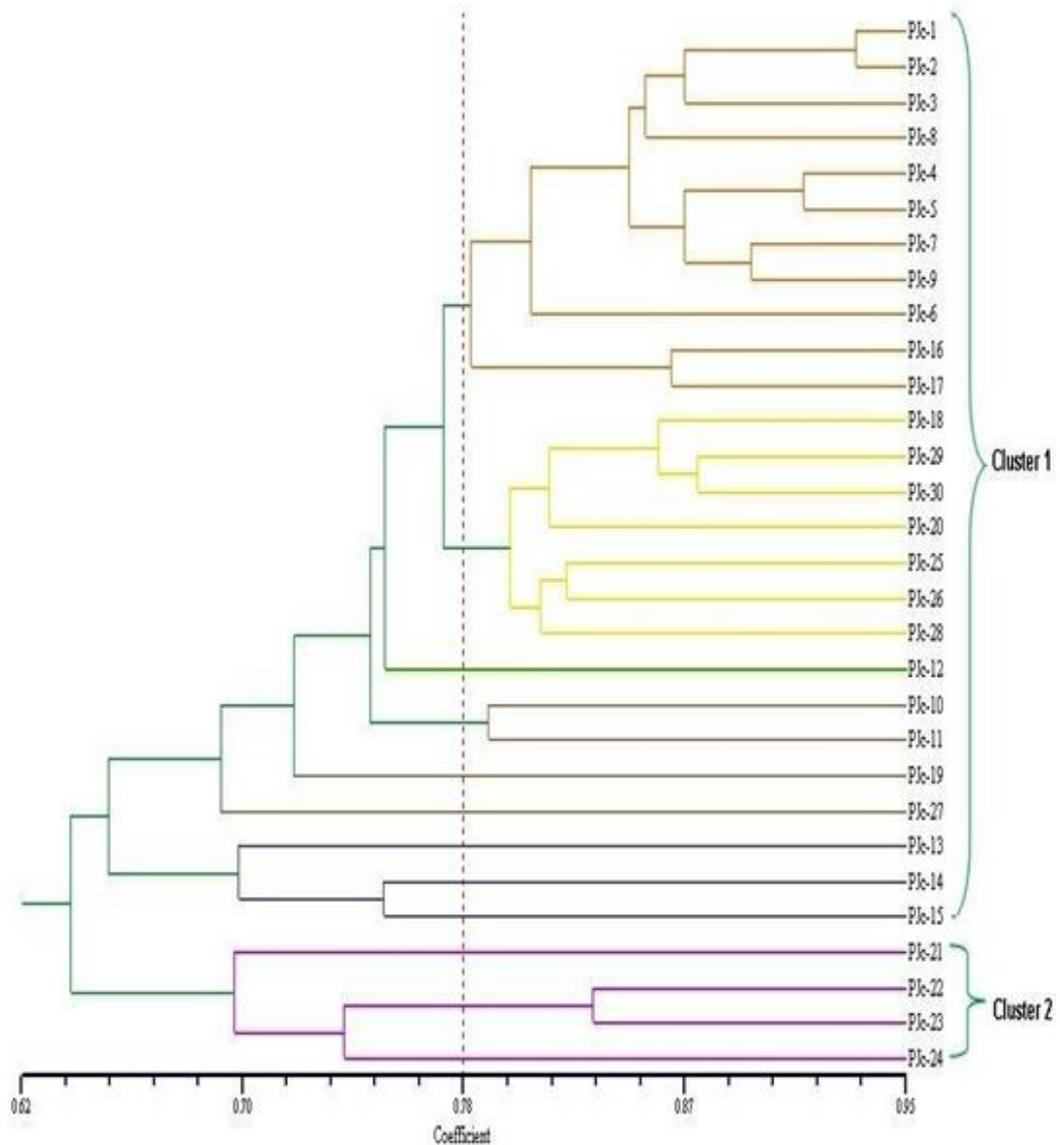
#### **4.5. Análisis de similitud.**

En base a la matriz binaria se detectó los loci polimórficos en relación directa a los 27 marcadores moleculares utilizados, paso seguido, se calculó la matriz similitud mediante el análisis del programa NTSYSpc 2.1, obteniéndose así el fenograma de los 30 individuos de *J. curcas* evaluados, con un coeficiente de similaridad de 0.78, en el fenograma se denota dos clusters bien definidos, de los cuales el cluster nº 1 agrupa 26 individuos de los 30 evaluados. Así mismo el Cluster nº1 posee dos sub-cluster a la vez (1.1 y 1.2) que agrupa a los individuos (JcP -1, JcP-2, JcP-3, JcP-4, JcP-5, J,cP-6, JcP-7, JcP-8, JcP-9, JcP-16, JcP-17) y (JcP-18, JcP-20, JcP-25, JcP-26, JcP-28, JcP-30) respectivamente, fenotípicamente compartían en promedio cantidad similar de lobulos de por hojas, de tres a cuatro lobulos pero, se diferenciaban en el grosor de casca por semilla, siendo ms grueso en el segundo subcluster, lo cual sería grato inferir que esta característica se detectó molecularmente. El segundo cluster agrupa un pequeño grupo de de 4 individuos correspondientes a la región San Martin (PJc-21, PJc-22, PJc-23, PJc-24) de los cuales se formar una pequeña rama separada del árbol, en consecuencia se podríamos llegar a pensar que se tratan de individuos híbridos, o alguna otra variedad de piñón blanco correspondiente al género *Jatropha*.

Así mismo se puede observar en el fenograma agrupaciones de individuos cercanos o similares entre sí, tanto de San Martin como de la Región Ucayalí, esto se puede deber a que no se encontró accesiones silvestre, más bien cultivadas que pudieron ser fácilmente trasladadas de

zona a otra de nuestra selva, aunque se sabe que esta planta aun se encuentra en un estado de semi- domesticación en nuestro país.

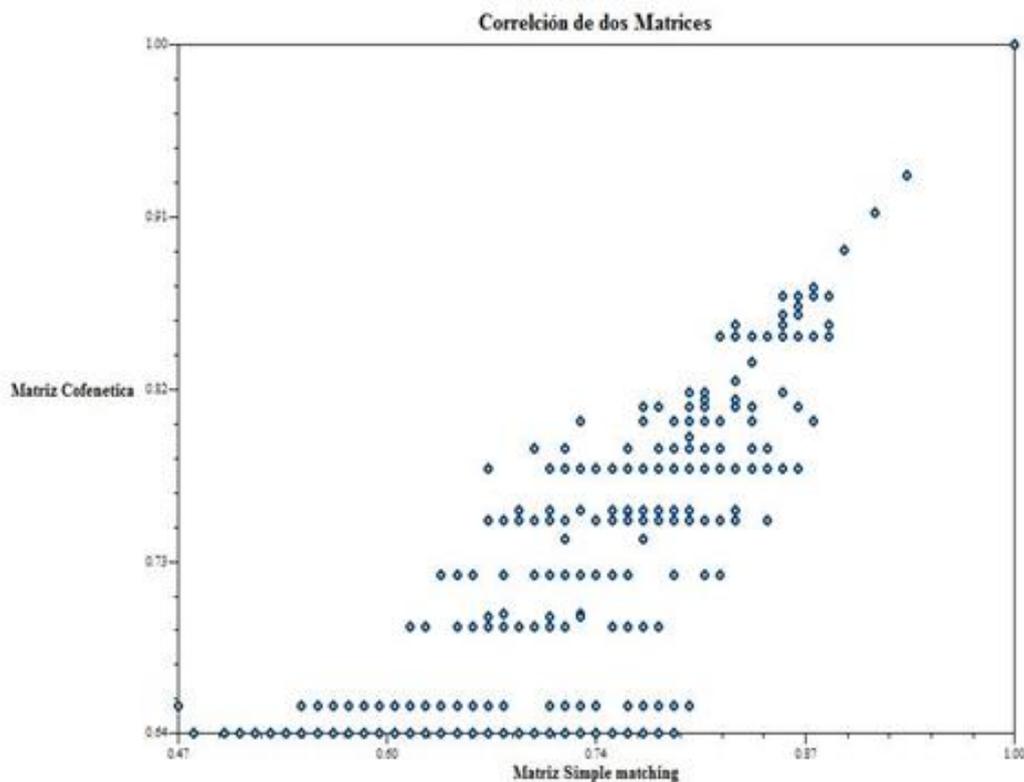
Los respectivos agrupamientos se refieren a características genóticas que comparten poblaciones y subpoblaciones, los cuales probablemente se expresen fenotípicamente, y estén relacionadas con su entorno.



**Figura 8.** Fenograma generado por el agrupamiento UGPMa; donde los individuos se disponen geoméricamente según su valor de similitud

## 4.6. Correlación de las matrices de similitud.

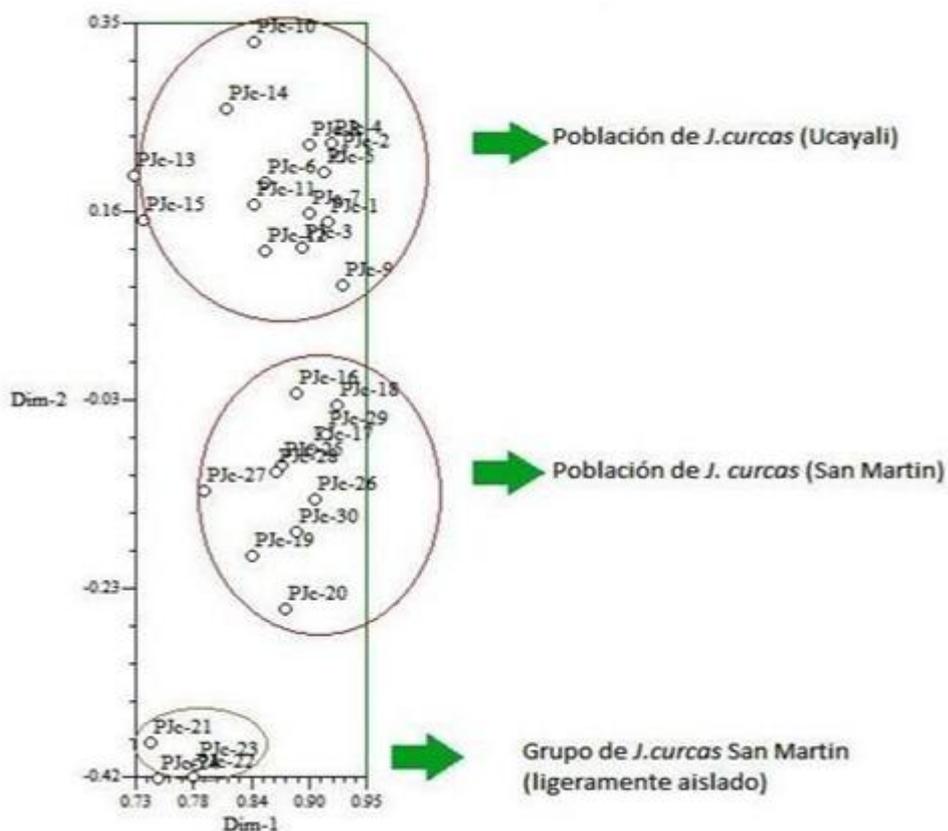
Con la finalidad de correlacionar los datos iniciales de similitud respecto al agrupamiento se realizó el test de Martel mediante el software NTSYSpc v2.1 de esta manera se calculó el coeficiente de correlación denominado “cofenético”, el cual mide el grado de distorsión que pueda tener el fenograma en relación a los datos iniciales de similitud, en este sentido se comprobó la fidelidad de nuestra matriz de similitud entre los individuos comparados, observándose una linealidad de las dos matrices; con un valor de  $r = 0.91975$ . Esto demuestra que la técnica de agrupamiento UPGMA origina una distorsión medianamente baja, como resultado los agrupamientos en el fenograma representan de manera precisa los valores de similitudes genéticas entre las 30 accesiones de *J. curcas*.



**Figura 9.** Consistencia de los datos del fenograma representados en la correlación de matrices, de los valores cofenéticos y los datos de similitud.

## 4.7. Análisis de coordenadas principales.

El análisis de coordenadas principales se logró determinar en base a los datos de la matriz de similitud (Simple Matching) , este ordenamiento no métrico bidimensional agrupa las poblaciones de *J. curcas* en relación a su localización geográfica, se nota claramente que correspondencia con los datos moleculares en relación a su medio, tanto como de la población *J. curcas* de Ucayali y de San Martín de Porres, exceptuando un pequeño grupo de individuos correspondientes a la región de San Martín que permanecen aisladas, lo que podría corresponder a individuos híbridos o variedades diferentes de *J. curcas* presentes en el Perú, lo cual enriquecería aún más nuestro germoplasma.



**Figura 10.** Análisis de Coordenadas Principales, coeficiente Simple Matching. Con el fin de correlacionar los individuos estudiados en relación a su entorno, genotipos más afines se agrupan entre sí.

## V. DISCUSIÓN

Fue de suma importancia obtener un ADN de alta calidad concentración y pureza dentro del rango de 1,80 y 2,00. Por esta razón se decidió utilizar el protocolo base de Doyle y Doyle (1990) con algunas modificaciones para su estandarización, se logró alcanzar diferentes grados de concentración de ADN desde 155.01 ng/μl hasta 3721.58 ng/μl (ver a tabla 4, pág. 47) así mismo se corroboró su pureza libre de contaminación mediante la electroforesis donde se obtuvo bandas nítidas de ADN genómico ( Figura nº5) así mismo no se presento ninguna inhibición durante los PCR que se realizaron en comparación a otros trabajos previos reportan contaminaciones altas concentraciones de proteínas, sales y ARN, (Maliyakal *et al.* 1992 y Kumar *et al.* 2003), reportes presentados por Chandra y Tewari (2007) manifiestaron que la presencia de un alto nivel de polisacáridos interfiere con el procedimiento de aislamiento del ADN inhibiendo la actividad de enzimas, como las de restricción, polimerasas y ligasas.

Las condiciones del PCR, fueron estandarizadas en base a la naturaleza de los primers, (Lowe, P. *et al* 2004). Se emplearon primers anclados, con la capacidad de alinearse al extremo 3' ó 5' y así amplificar muchos fragmentos ADN con diferente tamaño y peso molecular, lo cual incremento su capacidad de detectar polimorfismos (Wolfe A., 2000 & Pradeep, 2002) y enriqueció la naturaleza de presente investigación donde se logro obtener la proporción total de loci polimórficos de todos los individuos analizados corresponde a 34%

Las condiciones de amplificación del ADN genómico se basaron en un solo programa, en el cual solo se editó la temperatura de alineamiento específica para cada primer, realizando a su vez dos repeticiones más por primer, y así se seleccionó un patrón de bandas que al menos reportaron

más del 75% de reproductibilidad, con la finalidad de reducir los errores en el conteo de bandas durante la construcción de la matriz binaria conforme lo establecido por Armstrong (1999) se obtuvo un coeficiente de similaridad de 0.78 al (Simple Matching) en un rango al 99% a diferencia de lo reportado por Basha, *et al* 2007, quienes obtuvieron 0.573 al 0.97% para el mismo marcador molecular ISSR, con la salvedad que trabajaron con el coeficiente de Jacquard, esto nos demuestra que la variabilidad de la diversidad genética y similaridad de *J. curcas* puede variar según su procedencia geográfica.

El marcador Genético ISSR fue una gran herramienta para el estudio y análisis de la diversidad, de los 30 individuos del genotipo peruano, alcanzando una tasa de polimorfismo según el test de Martel de  $r = 0.91975$  cuyo valor se aproxima al 1 lo cual indica la riqueza genética de nuestro germoplasma, en comparación al genotipo de las accesiones indias que arrojaron un  $r = 0.79481$ ) reportadas por Basha, y Sujatha (2009) ; lo que quiere decir que molecularmente su perfil genético es pobre con baja tasa de diversidad genética, lo que con lleva a pensar que pese a que no se encontraron individuos silvestres durante la colecta, el tiempo de introducción de la planta a nuestro territorio es más antiguo que el genotipo indio.

De los 50 primers evaluados en los 30 individuos de *J. curcas* solo 27 fueron informativos en la diferenciación de polimorfismos; de los cuales se obtuvo 51 loci correspondientes a 1560 alelos en total, además, mediante el índice de polimorfismos o Polymorphic Index Content, se calculo el rango de alelos expresados y su frecuencia relativa, a fin de determinar que marcadores fueron más efectivos en la diferenciación de alelos polimórficos, los marcadores más efectivos fueron los primers (UBC807, UBC887, UBC835, UBC842, UBC856, UBC841, UBC836, UBC880, UBC810, UBC873) estos marcadores han sido reportados ampliamente en la bibliografía en investigaciones relacionadas a la caracterización genética, comprobándose así su gran capacidad de identificación de

regiones microsatélites para el análisis de la variedad genética. (Huang, J. C. y Sun, 2000; Pollegioni 2003; Mukta, 2009; K. Sujatha., *et al* 2006, 2007, 2008)

Pese que se logro estimar la heterocigosidad promedio ( $H_e$ ) , este dato relativamente puede variar si se compara con un marcador molecular codominante como los AFLP's o SSR, debido que los marcadores dominantes no permiten diferenciar entre individuos heterocigotos y homocigotos tal como lo manifiestan Pradeep y Sarla (2002), sin embargo se logro calcular la diversidad genética promedio ( $H_i$ ) cuyos valor expresa la distribución de los alelos dentro de una población con un índice de 0.4405, lo cual indica gran variabilidad genética de nuestro recurso, en comparación a los genotipos de india que revelan un índice mucho menor. (Basha & Sujatha, 2007, Ganesh Ram, 2007).

Todos los datos del análisis Molecular ISSR-PCR fueron evaluados utilizando el programa NTSys, a partir de la matriz binaria de 102x30, obteniéndose representaciones graficas que nos permitieron observar las agrupaciones de los clusters, y las relaciones de los diferentes OTUs conforme a su grado de similitud genética, en nuestro fenograma se denotan grupos que se pueden distinguir en diferentes colores, lo que hace pensar que existen subpoblaciones que comparten características únicas entre sí, en su mayoría las poblaciones de Ucayali y San Martín se agrupan en subclusters, exceptuando un grupo aislado de 4 individuos correspondientes a la región de San Martín (PJc21, PJc22, PJc23, PJc24), nuestro árbol fue contrastado con el diagrama de coordenadas principales, en el cual se corrobora el agrupamiento de cada OTU, en relación a su geografía o región. Estudios similares sobre la caracterización genética descritos por diferentes autores (Sharma y Dowsons, 1995; Ratnaparkhe et al., 1998; Blair *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 1998) han obtenido resultados similares en cuanto al agrupamiento y ordenamiento de los OTUs, pero ninguno de ellos difiere la existencia de

una nueva variedad de este cultivo dentro de las regiones o países donde realizaron sus estudios.

En el análisis de coordenadas principales (pág. 30) se denota que existe una correspondencia del análisis de similitud genética entre los individuos analizados con su entorno geográfico; las poblaciones de Ucayali y San Martín se agrupan entre sí, formando grupos diferenciados mas no aislados, aunque en el análisis molecular no se encontró la frecuencia de un alelo específico que las distinga entre una y otra, sin embargo esto refleja el modo de propagación clonal o vegetativa y su proceso de domesticación en relación a su entorno geográfico, en comparación a estudios realizados en poblaciones mexicanas se han encontrado a alelos únicos en individuos silvestre, cuyo perfil molecular es totalmente diferentes, a las accesiones estudiadas en otros países como en India y Asia (S.D. Basha y M. Sujatha 2007; D.V.N.S. Pamidimarri, S. Singh, S.G. Mastan, J. Patel & Reddy MP 2008)

## VI. CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos podemos concluir que:

- Se logró caracterizar el nivel de diversidad molecular presente las accesiones de *J. curcas* evaluadas utilizando el coeficiente de similitud Simple Matching.
- Se calculo el grado de riqueza genética a nivel de polimorfismo con un índice  $r = 0.91975$  (coeficiente cofénetico)
- Se estimo la proporción de loci polimórficos alcanzo el 34% para los marcadores utilizados.
- Se construyó el fenograma de relaciones filogenéticas y el grafico de coordenadas principales, que determinan grupos o clusters muy diferenciados del resto de la población de *J. curcas*. Agrupándose los individuos más cercanos entre sí, a su vez una correspondencia con su entorno geográfico.
- Se logro estimar la diversidad genética promedio ( $h_i$ ) = 0.4405 en relación a cada loci, que determina un alto grado de variabilidad genética correspondiente a las 30 accesiones analizadas.

## VII. RECOMENDACIONES

- Se recomienda base a la información obtenida dar paso a secuenciar el genoma de las poblaciones de *J. curcas* estudiadas en post de formar una colección nacional de germoplasma.
- Realizar mejoras genéticas de accesiones semi- domesticadas de *J. curcas* que contemplen segregación de marcadores moleculares, para que puedan establecerse relaciones con los genotipos parentales y obtener cualidades agronómicas deseables.
- Realizar otro tipo de análisis moleculares a las subpoblaciones muy diferenciadas de *J. curcas*, como el código de barras genético, que tiene la capacidad de diferenciar entre especies, subespecies o variedades, mediante el análisis de regiones conservadas del genoma del cloroplasto.
- Tomar en cuenta *Jatropha curcas*, como cultivo promisorio para la fabricación de biodiesel como una herramienta desarrollo rural, para la mejora de suelos desérticos, la producción de biodiesel y sus derivados como lo viene haciendo potencias emergentes, Brasil, India, México, entre otros.

## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Anon. (2001). The Potential of *Jatropha curcas* in rural development and environment protection An Exploration. Concept paper. In: Workshop sponsored by Rockefeller Foundation and Scientific & Industrial Research & Development Centre. Disponible en: <http://www.jatropha.de/zimbabwe/rf-conf1.htm>.

Armstrong, J., A. Gibbs., R. Peakall & G. Weiller. (1999). RAPDistance Package 1.04 Record and analyse of DNA fragment data 1.

Aponte Hernandez, C. (1978). Estudio de *Jatropha curcas* L. como recurso biótico. MSc. University Veracruz, Xalapa- Enriquez, Veracruz, México, xx,pp.

Arjun B. Chhetri, Martin S. Tango, Suzanne M. Budge, K. Chris Watts and M. Rafiqul Islam (2008) Non-Edible Plant Oils as New Sources for Biodiesel Production. ISSN 1422-0067

Basha, SD and Sujatha M. (2007). Inter and intra-population variability of *Jatropha curcas* (L.) characterized by RAPD and ISSR markers and development of population- specific SCAR markers. Euphytica 156:375–38

Basha, SD and M. Sujatha (2009). Genetic analysis of *Jatropha* species and interspecific hybrids of *Jatropha curcas* using nuclear and organelle specific markers. Volume 168, Number 2, 197-214, DOI: 10.1007/s10681-009-9900-0

Becerra V, Viviana; Paredes C, Mario (2000). Uso De Marcadores Bioquímicos y Moleculares en Estudios de Diversidad Genética. *Agric. Té.*; vol.60, no.3, p.270-281. ISSN 0365-2807

Blair MW, Panaud O, Mccouch SR (1999). Inter-simple sequence repeat (ISSR) amplification for analysis of microsatellite motif frequency and fingerprinting in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor. Appl. Genet.* 98: 780-792.

Cavalli-Sforza, L. L. y W. F. Bodmer. 1981. *Genética de las Poblaciones Humanas*. Ed. Omega, Barcelona

Cerrate, E (1969). *Manera de preparar plantas para un herbario*. Museo de Historia Natural (Lima). Serie de Divulgación No.1. 10 pp.

Cipriani, G., M.T. Marrazzo, R. Marconi, A. Cimato y R. Testolin. (2002). Microsatellite markers isolated in olive (*Olea europaea* L.) are suitable for individual fingerprinting and reveal polymorphism within ancient cultivars. *Theor. Appl. Genet.* 104:223-228

Chandra A., S. Tewari, 2007, Isolation of genomic DNA from *Stylo* species without liquid nitrogen suitable for RAPD and STS analyses. *Cytologia*, 72(3) , pp. 287-297 Doyle. JJ, Doyle. JL (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12:13-15

Dalirsefat SB, da Silva MA and Mirhoseini SZ (2009). Comparison of similarity coefficients used for cluster analysis with amplified fragment length polymorphism markers in the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Insect Sci.* 9: 1-8.

Dehgan, B. & G. L. Webster (1979). Morphology and infrageneric relations of the genus *Jatropha* (*Euphorbiaceae*). *Univ. Calif. Publ. Bot.* 74: 1-73.

Dehgan, B. 1984. Phylogenetic significance of interspecific hybridization in *Jatropha*(*Euphorbiaceae*). *Syst. Bot.* 9(4):467-478.

Doolittle, D.P. 1987. *Population Genetics: Basic Principles*. Springer-Verlag, Berlín.

D.V.N.S. Pamidimarri, S. Singh, S.G. Mastan, J. Patel, Reddy MP, Molecular characterization and identification of markers for toxic and non-

toxic varieties of *Jatropha curcas* L. using RAPD, AFLP and SSR markers, Mol. Biol. Rep. (2008), doi:10.1007/s11033-008-9320-6.

Ferreira ME, Grattapaglia D (1998). Introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético. EMBRAPA – CENARGEN. Documento 20. EMBRAPA-CENARGEN, Brasilia, Brasil

Freitas de Vasconcelos Melo, Marília; Silva-Mann, Renata; Santos, Heloisa Oliveira dos; SU0za, Erica Moraes de (2008) Caracterização morfológica de acessos de *Jatropha curcas* L. do Banco ativo de germoplasma da Universidade Federal de Sergipe. CEP: 49100-000.

Font, F. (2003). Las Especies del Género *Jatropha* L. (Euphorbiaceae, Crotonoideae) en Argentina. Revistadel Círculo de Coleccionistas de Cactus y Crasas de la República Argentina, Vol.2, N° 1.

Ganesh Ram, S., Parthiban, K. T., Senthil Kumar, R., Thiruvengadam, V., and Paramathma, M., 2007, Genetic diversity among *Jatropha species* as revealed by RAPD markers, Genet. Res. Crop Evol., DOI 10.1007/s10722-007-9285-7 Griffiths, A.J.F., J.H. Miller, D.T. Suzuki, R.C. Lewontin y W.M. Gelbart (eds.). 1996.

An Introduction to Genetic Analysis (6th edn.). Freeman and Co., NY.

Huang, J. C. and Sun, M., Theor. Appl.Genet., 2000, 100, 1050–1060.

Heller, J. (1996). Physic nut, *Jatropha curcas*. Promoting the Conservation and Use of Underutilized and Neglected Crops. International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI), Rome, Italy.

Instituto nacional de Innovación Agrícola “INIA” (2007) Perfiles de proyectos.

Identificación de Germoplasmas Promisorios de Piñón (*Jatropha curcas* L.), en la Región San Martín, Instituto de Cultivos Tropicales; II) Sistema de Vigilancia de la Degradación de Tierras y Validación Agroenergética

del Piñón (*Jatropha curcas*) en Pozuzo y alrededores. (SVVP-POZ)  
Instituto de Investigación y Capacitación

Agraria Pozuzo; III) Evaluación del Comportamiento Agronómico y Contenido de aceite de 2 ecotipos de Piñón (*Jatropha sp.*), en las provincias de Rioja, Moyobamba y San Martín; IV) Proyecto Especial Alto Mayo. Evaluación de cuatro ecotipos de Piñón (*Jatropha curcas* L) de la Región Tumbes, para la producción de biocombustible. Universidad Nacional de Tumbes. [www.inia.gob.pe/notas](http://www.inia.gob.pe/notas)

Jha. Timir baran , Priyanka Mukherjee and Mukul Manjari Datta (2007). Somatic embryogenesis in *Jatropha curcas* Linn., an important biofuel plant. *Plant Biotechnology Reports* 1: 135-140

Jones N, Miller J. H (1992). *Jatropha curcas*: A multipurpose Species for Problematic Sites,. The World Bank, Washington DC USA.

Karp A, Kresovich S, Bhat KV, Ayad WG, Hodgkin T (1997). Molecular tools in plant genetic resources conservation: A guide to the technologies; In: IPGRI Technical Bulletin No. 2. International Plant genetic Resources Institute, Rome Italy.

Kumar-Tiwari, A. Kumar A. Raheman H. (2007). Biodiesel production from *Jatropha* oil (*Jatropha curcas*) with high free fatty acids: An optimized process. *Biomass and Bioenergy*, 31, 569-575.

Keith, O. (2000) A review of *Jatropha curcas*: an oil plant of unfulfilled promise. *Biomass and Bioenergy* 19: 1-15

Kumar A., P. Pushpangadan and S. Mehrotra, 2003, Extraction of high molecular weight DN from dry root tissue of *Berberis lyceum* suitable for RAPD. *Plant Molecular Biology*, 21, pp. 309a-309b.

León, Blanca; Riina, Ricarda; Berry, Paul. Euphorbiaceae endémicas del Perú. (2006) *Rev. Perú biol.*, dez. vol.13, no.2, p.295-301. ISSN 1727-9933.

Litt, M. y J. A. Luty. 1989. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *American Journal of Human Genetics*. 44: 397-401

Llorente, J. 1989. Algunas ideas de la teoría sistemática contemporánea: conceptos del cladismo. *Ciencias*, número especial 3: 74-87

Lowe, A.; Harris, S.; Ashton, P. 2004. *Ecological genetics; design, analysis, and application*. Blackwell Science. Victoria, Australia. 326 p.

Makkar, H.P.S, Becker, K. and Schmook, B. (1997). Edible provenances of *Jatropha curcas* from Quintana Roo State of Mexico and effect of roasting on antinutrient and toxic factors in seeds. *Institute for Animal Production in the Tropics and Subtropics* (480), University of Hohenheim, D- 70593 Stuttgart, Germany. 6 pp.

Maliyakal E.J., 1992, An efficient method for isolation of RNA and DNA from plants containing polyphenolics. *Nucleic Acids Research*, 20, pp. 2381.

Morgante, M. Olivieri, A. (1993). PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. *Plant J*. 3:175-182

Münch, E. 1986. *Die Purgiernuß (Jatropha curcas L.) - Botanik, Ökologie, Anbau*. Diplomathesis. University Hohenheim, Stuttgart.

Mukta, N., Murthy, I. Y. L. N. and Sripal, P., *Ind. Crops. Prod.*, 2009, 29, 536– 540

Pramanik. K (2003) Properties and use of jatropha curcas oil and diesel fuel blends in compression ignition engine. *Renewable Energy* 28: 239– 248

Pollegioni, P., Bartoli, S., Cannata, F. and Malvolti, M. E., *J. Genet. Breed.*, 2003, 57, 231-240

Pradeep R, Sarla N. and Siddiq E.A., (2002). Inter simple sequence repeats (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica* 128(1):9-17

Ratnaparkhe MB, Gupta VS, VenMurthy MR, Ranjekar PK (1995). Genetic fingerprinting of pigeonpea (*Cajanus cajan*) and its wild relatives using RAPD markers. *Theor. Appl. Genet.* 91: 893-898.

Rozas, J. y R. Rozas. 1995. DnaSP, DNA sequence polymorphism: an interactive program for estimating population genetics parameters from DNA sequen data. *Comput. Appl. Biosci.* 11:621-625.

Ruiz De Galarreta, J.I. 1993. Agrupación de poblaciones locales de maíz (*Zea mays* L.) mediante caracteres morfológicos y parámetros ambientales. Tesis. Departamento de Producción Vegetal y Ciencia Forestal. Universidad de Lleida, España.

Severino, L. S., Ferreira, G. B., Moraes, C. R. de A., Gondim, T. M de. S., Freire, W. S de. A., Castro, D. A. de, Cardoso, G. D., Beltrão, N. E de. M. (2006)

Crescimento e produtividade da mamoneira adubada com macronutrientes e micronutrientes. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 41, n. 4, p. 563-568,

Sathaiah V, Reddy TP (1985) Seed protein profiles of castor (*Ricinus communis* L.) and some Jatrophaspecies. *Genet Agr* 39:35–43

Sharma SK, Dowsons IK, Waugh R (1995). Relationships among cultivated and wild lentils revealed by RAPD analysis. *Theor. Appl. Genet.* 91: 647-654.

Sokal, R.R. and Michener (1958). C.D. A Statistical Method for Evaluating Systematic Relationships. *The University of Kansas Scienti Bulletin* 38:1409-1438.

Sujatha, K. and Hazra, S., *In Vitro Cell. Dev. Biol.–Plant*, 2007, 43(6), 608–613.

Sujatha, K., Panda, B. M. and Hazra, S., *Trees*, 2008, 22, 711–716.

Sujatha, K. and Hazra, S., *J. Plant Biotechnol.*, 2006, 33(4), 263–270.

Sujatha, M; Makkar, H.P.S; Becker, K. (2005) Shoot bud proliferation from axillary nodes and leaf sections of non-toxic *Jatropha curcas* L. *Plant Growth Regul* 47:83– 90 49. Sujatha M; Prabakaran AJ (2003) New ornamental *Jatropha* hybrids through interspecific hybridization. *Genet ResU0r Crop Evol* 50:75–82

Shweta Shah, Aparna Sharma, M.N. Gupta (2005). Extraction of oil from *Jatropha curcas* L. seed kernels by combination of ultrasonication and aqueU0s enzymatic oil extraction. *BioresU0rce Technology* 96: 121-123

SIDTA. 1999. Los marcadores moleculares en ingeniería genética y en mejora vegetal. España. Consultado 1 agosto 2002. Disponible en: <http://www.jcyl.es/jcyl/cag/dgiadr/svidta/boletin/dic99/bold.html#los%20marcadores%20moleculares%20en%20ingenieria%20genetica>

Tien - Hung Lan, Terrye A. DelMonte, Kim P. Reischmann (2002) An EST-enriched Comparative Map of *Brassica oleracea* and *Arabidopsis thaliana*. *Genome Res.* 2000 10: 776-788

Volgel J.M, Scolnik P.A. (1997). Direct amplification from microsatellites: detection of simple sequence repeat based polymorphisms withU0t cloning. In: DNA markers: protocols, applications, and overviews. Ed by Caetano-Anollés G., Gresshoff P.M. New York. 364 p.

Vicente, M.C. y Fulton, T. (eds.). 2003. Tecnologías de marcadores moleculares para estudios de diversidad genética de plantas: Módulo de Aprendizaje. Bioversity International. Roma, Italia. [www.bioversityinternational.org](http://www.bioversityinternational.org)

Wang G, Mahalingam R, Knap HT (1998). (C-A) and (G-A) anchored simple sequence repeats (ASSRs) generated polymorphism in soybean, *Glycine max* (L.) Merr. Theor. Appl. Genet. 96: 1086-1096.

Westman, A.L. y S. Kresovich. (1999). Simple sequence repeats (SSR)-based marker variation in *Brassica nigra* genebank accessions and weed populations. Euphytica 109:85-92.

Williams J.G.K.,A.R. Kubelic, K.J. Livak, J.A. Rafalski, S.V. Tingey, 1990 DN polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acid. Res. 18:6531-6535.

Wei. Q, Wei-Da Lu, Yi Liao, Shu-Lin Pan, Xu Ying, Tang Lin, Fang Chen (2004) Plant regeneration from epicotyl explants of *Jatropha curcas*. J Plant Physiol Mol Biol 30:475–478

Weber, J.L. and P.E. May. 1989. Abundant class of human DNA polymorphism which can be typed using the polymerase chain reaction. American Journal of Human Genetics, 44:388-396.

Wolfe A., 2000. ISSR Resource Website. <http://www.biosci.ohio-state.edu/~awolfe/ISSR/ISSR.htm>

Zietkiewicz, E.; A. Rafalski; D. Labuda (1994). Genome finger-printing by Simple Sequence Repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. Genomics 20:176-183.

Zhang LY, Bernard M, Leroy P, Feuillet C, Sourdille P (2005) High transferability of bread wheat EST-derived SSRs to other cereals. Theor Appl Genet 111:677– 687

**Tabla 3.** Georreferencia de los individuos colectados en las regiones de Ucayalí y San Martín

Muestra	Distrito	Localidad	Altitud	Coordenada S	Coordenada W
U0001	Carr.Km 15 a Curimana	Curimana	182	08° 35' 04,8"	075° 00' 42,4"
U0002	Carr.Km 20 a Curimana	Curimana	188	08° 30' 55,9"	075° 03' 56,2"
U0003	Carr.Km 22.5 aCurimana	Curimana	186	08° 29' 11,0"	075° 04' 54,2"
U0004	Carr. A Curimaná	Curimana	184	08° 28' 20,9"	075° 05' 13,9"
U0005	Carretera a Curimaná	Curimana	183	08° 27' 29,1"	075° 05' 35,5"
U0006	Ciudad de Curimaná	Curimana	175	08° 25' 55,7"	075° 09' 38,4"
U0007	Cementerio de la Ciudad	Curimana	173	08° 25' 36,9"	075° 09' 27,3"
U0008	Ciudad de Curimaná	Curimana	173	08° 26' 16,3"	075° 09' 32,1"
U0009	Ciudad de Curimaná	Curimana	171	08° 26' 13,3"	075° 09' 04,2"
U00010	Ciudad de Curimaná	Curimana	203	08° 25' 47,8"	075° 08' 32,4"
U00011	La Pimental	Campoverde	203	08° 29' 33,9"	074° 48' 26,2"
U00012	La Pimental	Campoverde	215	08° 31' 24,5"	074° 48' 22,7"
U00013	La Pimental	Campoverde	216	08° 31' 18,8"	074° 48' 20,5"
U00014	Carr. Km 9 a TU0rvavista	Campoverde	206	08° 33' 46,5"	074° 48' 10,2"
U0015	Carr.Km 11 TU0rnavista	Campoverde	208	08° 34' 53,5"	074° 48' 04,2"
U00016	Carr Km 40 TU0rnavista	TU0rnavista	224	08° 49' 48,2"	074° 48' 01,9"
U00017	Carr.Km 41.3TU0rnavista	TU0rnavista	203	08° 50' 19,7"	074° 47' 46,4"
U00018	Carr.Km 30 aTU0rnavista	TU0rnavista	190	08° 53' 31,8"	074° 47' 19,8"
U00019	Ciudad de TU0rnavista	TU0rnavista	80	08° 55' 36,9"	074° 42' 40,9"
U00020	Ciudad deTuornavista	Tuornavista	90	08° 56' 03,9"	074° 42' 01,7"
U00021	Ciudad de Yarina	Yarinacocha	62	08° 21' 10,8"	074° 34' 38,3"
U00022	San Lorenzo	Yarinacocha	152	08° 20' 42,8"	074° 35' 48,6"
U00023	San Lorenzo	Yarinacocha	151	08° 20' 19,7"	074° 36' 07,0"
U00024	San José	Yarinacocha	151	08° 20' 16,5"	074° 35' 52,6"
U00025	San Juan	Yarinacocha	153	08° 19' 28,8"	074° 36' 11,5"
U00026	San Juan	Yarinacocha	158	08° 19' 18,7"	074° 36' 14,3"
U00027	Santa Rosa	Yarinacocha	157	08° 18' 18,0"	074° 37' 03,5"
U00028	Santa Rosa	Yarinacocha	155	08° 18' 20,8"	074° 37' 08,0"
U00029	Santa Rosa	Yarinacocha	160	08° 18' 17,3"	074° 37' 15,2"
U00030	Santa Rosa	Yarinacocha	149	08° 17' 45,6"	074° 37' 33,2"
U00031	Cashibococha-San Salvador	Yarinacocha	155	08° 19' 01,4"	074° 37' 52,2"
U00032	Cashibococha-San Salvador	Yarinacocha	153	08° 18' 50,9"	074° 37' 59,1"
U00033	Cashibococha-San Salvador	Yarinacocha	153	08° 18' 36,4"	074° 38' 05,8"
U00034	Cashibococha-San Salvador	Yarinacocha	145	8°20'3.89"	74°39'1.47"
U00035	Cashibococha-San Salvador	Yarinacocha	150	08° 20' 06,6"	074° 38' 07,1"
U00036	Villa Primavera	Yarinacocha	150	08° 21' 33,3"	074° 37' 25,9"
U00037	Villa Primavera	Yarinacocha	137	08° 21' 50,6"	074° 37' 21,9"
U00038	Villa Primavera	Yarinacocha	142	08° 22' 19,5"	074° 37' 12,6"
U00039	Villa Primavera	Yarinacocha	139	08° 22' 46,2"	074° 37' 11,0"
U00040	Villa Primavera	Yarinacocha	137	08° 22' 46,1"	074° 37' 18,1"
U00041	Fraternidad Unida	Masisea	132	08° 33' 45,0"	074° 17' 10,0"

Muestra	Distrito	Localidad	Altitud	Coordenada S	Coodenada W
U00042	C.Nativa Nueva Zeilán	Masisea	156	08° 37' 27,6"	074° 16' 32,4"
U00043	C.Nativa Nueva Zeilán	Masisea	162	08° 37' 31,0"	074° 16' 32,2"
U00044	C.Nativa Nueva Zeilán	Masisea	162	08° 37' 38,1"	074° 16' 27,8"
U00045	C.Nativa Nueva Zeilán	Masisea	162	08° 37' 42,4"	074° 16' 27,4"
U000 46	C.Nativa Nueva Zeilán	Masisea	158	08° 37' 35,9"	074° 16' 36,9"
U000 47	C.Nativa Cashuera	Masisea	155	08° 36' 56,8"	074° 17' 05,7"
U000 48	C.Nativa Cashuera	Masisea	154	08° 36' 54,7"	074° 17' 09,3"
U000 49	C.Nativa Cashuera	Masisea	154	08° 37' 01,3"	074° 17' 11,7"
U000 50	Fraternidad Unida	Masisea	156	08° 32' 39,1"	074° 18' 45,4"
SM000 1	Chazuta	Chazuta	202	06° 37' 08.1"	076°10' 52.03"
SM000 2	Chazuta	Chazuta	206	06° 34' 32.6"	076° 08' 30.2"
SM000 3	Chazuta	Chazuta	196	06° 34' 32.7"	076° 08' 29.9"
SM000 4	Chazuta	Chazuta	197	06° 34' 17.8"	076° 07' 39.5"
SM000 5	Chazuta	Chazuta	184	06° 34' 20.8"	076° 08' 24.7"
SM000 6	Chazuta	Chazuta	207	06° 36' 24.1"	076° 09' 12.5"
SM000 7	Shapaja	Shapaja	232	06° 35' 01.9"	076° 15' 06.0"
SM000 8	Shapaja	Shapaja	213	06° 34' 44.2"	076° 15' 49.9"
SM000 9	Juanguerra	Juanguerra	224	06° 34' 43.1"	076° 19' 39.8"
SM00 10	Juanguerra	Juanguerra	212	06° 34' 43.1"	076° 19' 39.8"
SM00 11	Juanguerra	Juanguerra	203	06° 34' 55.3"	076° 20' 16.7"
SM00 12	San José de Sisa	San José de Sisa	359	06° 34' 55.3"	076° 20' 17.1"
SM00 13	San José de Sisa	San José de Sisa	367	06° 36' 54.1"	076° 40' 50.8"
SM00 14	San José de Sisa	San José de Sisa	355	06° 36' 55.2"	076° 40' 56.4"
SM00 15	San José de Sisa	San José de Sisa	355	06° 36' 03.2"	076° 41' 39.9"
SM00 16	San José de Sisa	San José de Sisa	359	06° 35' 52.8"	076° 41' 49.5"
SM00 17	San José de Sisa	San José de Sisa	349	06° 37' 18.9"	076° 42' 03.7"
SM00 18	San José de Sisa	San José de Sisa	385	06° 37' 00.0"	076° 41' 32.5"
SM00 19	San José de Sisa	San José de Sisa	343	06° 37' 25.7"	076° 41' 58.7"
SM00 20	San José de Sisa	San José de Sisa	348	06° 37' 33.8"	076° 41' 59.3"
SM00 21	San José de Sisa	San José de Sisa	345	06° 37' 40.0"	076° 41' 59.8"
SM00 22	Cuñumbuque	Cuñunbuque	604	06° 37' 08.8"	076° 41' 46.1"
SM00 23	Cuñumbuque	Cuñunbuque	541	06° 34' 46.5"	076° 30' 15.9"
SM00 24	Cuñumbuque	Cuñunbuque	515	06° 34' 19.9"	076° 29' 30.8"
SM00 25	Cuñumbuque	Cuñunbuque	440	06° 34' 20.1"	076° 29' 31.0"
SM00 26	Cuñumbuque	Cuñunbuque	418	06° 33' 44.6"	076° 29' 16.8"
SM00 27	Cuñumbuque	Cuñunbuque	402	06° 33' 14.0"	076° 29' 17.1"
SM00 28	Cuñumbuque	Cuñunbuque	375	06° 32' 58.6"	076° 29' 17.7"
SM00 29	Cuñumbuque	Cuñunbuque	279	06° 31' 07.5"	076° 29' 17.9"
SM00 30	Cuñumbuque	Cuñunbuque	251	06° 31' 08.0"	076° 29' 17.7"
SM00 31	Cuñumbuque	Cuñunbuque	287	06° 30' 19.6"	076° 28' 39.4"
SM00 32	San Rafael	La Libertad	234	07° 01' 50.1"	076° 28' 26.9"
SM00 33	San Rafael	La Libertad	233	07° 01' 58.6"	076° 28' 41.7"
SM00 34	San Rafael	La Libertad	232	07° 02' 00.0"	076° 28' 38.3"

Muestra	Distrito	Localidad	Altitud	Coordenada S	Coodenada W
SM00 35	San Rafael	La Libertad	235	07° 01' 58.4"	076° 28' 26.9"
SM00 36	San Rafael	La Libertad	236	07° 01' 34.0"	076° 29' 47.8"
SM00 37	San Hilarión	San Hilarión	238	07° 00' 21.8"	076°26'26.5"
SM00 38	San Hilarión	San Hilarión	235	07° 00' 16.7"	076°26'15.8"
SM00 39	Picota	Picota	233	06° 59' 36.2"	076°25'39.0"
SM00 40	Picota	Picota	231	06° 55' 22.9"	076°20'31.5"
SM00 41	Picota	Picota	234	06° 54' 52.6"	076°20'01.2"
SM0042	Lamas	Lamas	797	06° 47' 24.4"	076°19'43.7"
OSM 43	Lamas	Lamas	777	06° 25' 18.4"	076°31'30.6"
OSM 44	Lamas	Lamas	751	06° 25' 18.6"	076°31'30.8"
OSM 45	Lamas	Lamas	793	06° 25' 19.8"	076°31'08.2"
OSM 46	Lamas	Lamas	743	06° 25' 16.1"	076°30'40.6"
OSM 47	Lamas	Lamas	810	06° 24' 51.9"	076°31'23.0"
OSM 48	Rumisapa	Rumisapa	350	06° 24' 52.2"	076°31'23.1"
OSM 49	Rumisapa	Rumisapa	344	06° 27' 23.0"	076°27'38.3"
OSM 50	Cacatachi	Cacatachi	320	06° 27' 36.1"	076°27'17.5"
OSM 51	Cacatachi	Cacatachi	313	06° 27' 35.9"	076°27'17.3"
OSM 52	San Antonio	San Antonio de Cumbaza	423	06° 28' 25.5"	076°23'47.3"

**Tabla 4.** Concentración y calidad de ADN de las mejores muestras de J, curcas

Muestras	Códigos	Concentraciones ng/ul	Diluciones
U0002	PJc-1	1039.3	100
U0004	PJc-2	1108.59	100
U0008	PJc-3	1992.49	100
U0014	PJc-4	294.55	100
U0008	PJc-5	1054.82	100
U0021	PJc-6	808.18	100
U0024	PJc-7	539.62	100
U0027	PJc-8	1229.92	100
U0031	PJc-9	779.7	100
U0034	PJc-10	454.09	100
U0038	PJc-11	667.47	100
U0034	PJc-12	1201.56	100
U0043	PJc-13	1170.08	100
U0047	PJc-14	950.37	100
U0050	PJc-15	2269.86	100
SM001	PJc-16	1218.32	100
SM004	PJc-17	177.25	100
SM009	PJc-18	1282.41	100
SM010	PJc-19	369.35	100
SM013	PJc-20	3059.25	100
SM019	PJc-21	3721.58	100
SM022	PJc-22	2176.31	100
SM025	PJc-23	1343.23	100
SM030	PJc-24	2465.29	100
SM035	PJc-25	1115.62	100
SM041	PJc-26	2948.92	100
SM045	PJc-27	1910.53	100
SM047	PJc-28	256.08	100
SM048	PJc-29	155.01	100
SM050	PJc-30	385.82	100





**Tabla 6.** Recuento de Loci polimórficos Monomórficos, porcentajes descriptivos por Locus

Loci (l)	Primer	Presencia	Ausencia	Mising data (9)	Total	N° de loci monomorfico (101)	N° de loci polimórfico (51)	Porcentaje de polimorfismo por loci
A1	UBC807-1	11	19		30	4	5	8%
A2	UBC807-2	27	3		30			
A3	UBC807-3	18	12		30			
A4	UBC807-4	25	5		30			
A5	UBC807-5	20	10		30			
A6	UBC807-6	24	6		30			
A7	UBC807-7	27	3		30			
A8	UBC807-8	21	9		30			
A9	UBC807-10	29	1		30			
B1	UBC808-1	3	27		30	2	2	3.04%
B2	UBC808-2	7	23		30			
B3	UBC808-3	19	11		30			
B4	UBC808-4	28	2		30			
C1	UBC809-1	16	14		30	1	4	6.80%
C2	UBC809-2	28	2		30			
C3	UBC809-3	25	5		30			
C4	UBC809-4	22	8		30			
C5	UBC809-5	22	8		30			
D1	UBC810-1	16	14		30	2	4	6.80%
D2	UBC810-2	10	20		30			
D3	UBC810-3	24	6		30			
D4	UBC810-4	22	8		30			
D5	UBC810-5	29	1		30			
D6	UBC810-6	26	4		30			
E1	UBC812-1	16	14		30	2	3	4.56%
E2	UBC812-2	30	0		30			
E3	UBC812-3	25	5		30			
E3	UBC812-4	30	0		30			
E5	UBC812-5	13	17		30			
F1	UBC816-1	27	3		30	9	2	3.04%
F2	UBC816-2	21	3		30			
F3	UBC816-3	29	1		30			
F4	UBC816-4	23	7		30			
F5	UBC816-5	30	0		30			
F6	UBC816-6	29	1		30			
F7	UBC816-7	30	0		30			
F8	UBC816-8	30	0		30			

G1	UBC823-1	29	1		30			
G2	UBC823-2	21	8	1	30			
G3	UBC823-3	28	1	1	30			
H1	UBC830-1	23	7		30			
H2	UBC830-2	25	5		30	2	2	3.04%
H3	UBC830-3	30	0		30			
H4	UBC830-4	30	0		30			
I1	UBC834-1	29	1		30			
I2	UBC834-2	23	7		30			
I3	UBC834-3	28	2		30	4	1	1.52%
I4	UBC834-4	30	0		30			
I5	UBC834-5	28	2		30			
J1	UBC835-1	30	0		30			
J2	UBC835-2	25	5		30			
J3	UBC835-3	28	2		30			
J4	UBC835-4	14	16		30			
J5	UBC835-5	28	2		30	8	2	3.04%
J6	UBC835-6	29	1		30			
J7	UBC835-7	28	2		30			
J8	UBC835-8	27	3		30			
J9	UBC835-9	26	4		30			
J10	UBC835-10	30	0		30			
K1	UBC836-1	29	1		30			
K2	UBC836-2	30	0		30			
K3	UBC836-3	27	3		30			
K4	UBC836-4	28	2		30	5	2	3.04%
K5	UBC836-5	24	6		30			
K6	UBC836-6	27	3		30			
K7	UBC836-7	22	8		30			
L1	UBC840-1	26	4		30			
L2	UBC840-2	28	2		30			
L3	UBC840-3	29	1		30	5	0	0%
L4	UBC840-4	26	4		30			
L5	UBC840-5	30	0		30			
M1	UBC841-1	29	1		30			
M2	UBC841-2	21	9		30			
M3	UBC841-3	14	16		30			
M4	UBC841-4	27	3		30			
M5	UBC841-5	28	2		30	6	3	4.56%
M6	UBC841-6	12	18		30			
M7	UBC841-7	26	4		30			
M8	UBC841-8	30	0		30			
M9	UBC841-9	30	0		30			

N1	UBC842-1	14	16		30	1	6	9.12%
N2	UBC842-2	22	8		30			
N3	UBC842-3	23	7		30			
N4	UBC842-4	16	14		30			
N5	UBC842-5	27	3		30			
N6	UBC842-6	25	5		30			
N7	UBC842-7	19	11		30			
O1	UBC861-1	30	0		30	3	0	0%
O2	UBC861-2	28	2		30			
O3	UBC861-3	30	0		30			
P1	UBC856-1	20	10		30	1	5	7.60%
P2	UBC856-2	26	4		30			
P3	UBC856-3	25	5		30			
P4	UBC856-4	21	9		30			
P5	UBC856-5	25	5		30			
P6	UBC856-6	25	5		30			
Q1	UBC868-1	26	4		30	4	1	1.52%
Q2	UBC868-2	29	1		30			
Q3	UBC868-3	25	5		30			
Q4	UBC868-4	29	1		30			
Q5	UBC868-5	30	0		30			
R1	UBC873-1	28	1	1	30	5	1	1.52%
R2	UBC873-2	24	5	1	30			
R3	UBC873-3	28	1	1	30			
R4	UBC873-4	26	2	2	30			
R5	UBC873-5	27	3		30			
R6	UBC873-6	26	4		30			
S1	UBC880-1	16	14		30	5	2	3.04%
S2	UBC880-2	24	6		30			
S3	UBC880-3	26	4		30			
S4	UBC880-4	27	3		30			
S5	UBC880-5	30	0		30			
S6	UBC880-6	29	1		30			
S7	UBC880-7	28	2		30			
T1	UBC885-1	29	1		30	6	0	0%
T2	UBC885-2	30	0		30			
T3	UBC885-3	30	0		30			
T4	UBC885-4	28	2		30			
T5	UBC885-5	30	0		30			
T6	UBC885-6	30	0		30			

U1	UBC886-1	30	0		30	6	0	0%
U2	UBC886-2	28	2		30			
U3	UBC886-3	30	0		30			
U4	UBC886-4	30	0		30			
U5	UBC886-5	30	0		30			
U6	UBC886-6	30	0		30			
V1	UBC887-1	22	8		30	7	2	3.04%
V2	UBC887-2	28	2		30			
V3	UBC887-3	26	4		30			
V4	UBC887-4	29	1		30			
V5	UBC887-5	27	3		30			
V6	UBC887-6	23	7		30			
V7	UBC887-7	29	1		30			
V8	UBC887-8	28	2		30			
V9	UBC887-9	27	3		30			
W1	UBC888-1	30	0		30	4	0	0%
W2	UBC888-2	30	0		30			
W3	UBC888-3	28	2		30			
W4	UBC888-4	30	0		30			
X1	UBC891-1	26	4		30	8	1	1.52%
X2	UBC891-2	30	0		30			
X3	UBC891-3	29	1		30			
X4	UBC891-4	27	3		30			
X5	UBC889-1	29	1		30			
X6	UBC889-2	27	3		30			
X7	UBC889-3	30	0		30			
X8	UBC889-4	30	0		30			
X9	UBC889-5	25	5		30			
Y1	UBC813-1	24	6		30	1	3	4.56%
Y2	UBC813-2	11	19		30			
Y3	UBC813-3	25	5		30			
Y4	UBC813-4	29	1		30			
Proporción polimórfica [P=npj/ntotal] 0.34								34%

**Tabla 7.** Valores descriptivos de la diversidad genética por cada locus de *J. curcas*.

Loci	PRIMERS UBC	N° de presencias	N° de ausencias	P (freq genotípica)	Q (freq genotípica)	p (freq alélicas presencias)	q (freq alélicas ausencias)	PIC=1-p2-q2	índice del marcador ISSR	diversidad genética dentro del locus ( $h=1-\sum p_i^2$ )	La diversidad genética promedio ( $H_i = \sum L_i h_i / L$ )
A1	UBC807-1	11	19	0,37	0,63	0,20	0,80	0,325	2.751	0,3250	
A3	UBC807-3	18	12	0,60	0,40	0,37	0,63	0,465		0,4649	
A4	UBC807-4	25	5	0,83	0,17	0,59	0,41	0,483		0,4832	
A5	UBC807-5	20	10	0,67	0,33	0,42	0,58	0,488		0,4880	
A8	UBC807-6	24	6	0,80	0,20	0,55	0,45	0,494		0,4944	
B2	UBC807-8	21	9	0,70	0,30	0,45	0,55	0,495	0.793	0,4954	
B3	UBC808-2	7	23	0,23	0,77	0,12	0,88	0,218		0,2179	
C1	UBC808-3	19	11	0,63	0,37	0,39	0,61	0,478	1.915	0,4777	
C3	UBC809-1	16	14	0,53	0,47	0,32	0,68	0,433		0,4329	
C4	UBC809-3	25	5	0,83	0,17	0,59	0,41	0,483		0,4832	
C5	UBC809-4	22	8	0,73	0,27	0,48	0,52	0,499		0,4995	
D1	UBC809-5	22	8	0,73	0,27	0,48	0,52	0,499	1.726	0,4995	
D2	UBC810-1	16	14	0,53	0,47	0,32	0,68	0,433		0,4329	
D3	UBC810-2	10	20	0,33	0,67	0,18	0,82	0,300		0,2997	
D4	UBC810-3	24	6	0,80	0,20	0,55	0,45	0,494		0,4944	
E1	UBC810-4	22	8	0,73	0,27	0,48	0,52	0,499	1.288	0,4995	
E3	UBC812-1	16	14	0,53	0,47	0,32	0,68	0,433		0,4329	
E5	UBC812-3	25	5	0,83	0,17	0,59	0,41	0,483		0,4832	
F4	UBC812-5	13	17	0,43	0,57	0,25	0,75	0,372		0,3722	
G2	UBC816-4	23	7	0,77	0,23	0,52	0,48	0,499	0.499	0,4994	
H1	UBC830-1	23	7	0,77	0,23	0,52	0,48	0,499	0.983	0,4994	
H2	UBC830-2	25	5	0,83	0,17	0,59	0,41	0,483		0,4832	
I2	UBC834-2	23	7	0,77	0,23	0,52	0,48	0,499	0.499	0,4994	
J2	UBC835-2	25	5	0,83	0,17	0,59	0,41	0,483	1.260	0,4832	
J4	UBC835-4	14	16	0,47	0,53	0,27	0,73	0,394		0,3939	
K5	UBC835-5	28	2	0,93	0,07	0,74	0,26	0,383		0,3831	



### Matriz de similitud generada por el programa NTSYS.

Output: NTSYSpc 2.11X, (C) 2000-2005, Applied Biostatistics Inc.

Input parameters: Read input from file: C:\Users\48241\Desktop\issrtesis\issr.NTS

Format: width=9 decimals=3 Page width: 160 Field width: 9 Decimal places: 3

Page width: 160 Comments: SIMQUAL: input=C:\Users\48241\Desktop\issrtesis\issr.NTS, coeff=SM by Cols

Matrix type = 3, size = 30 by 30, missing value code = "none" (similarity)

	PJc-1	PJc-2	PJc-3	PJc-4	PJc-5	PJc-6	PJc-7	PJc-8	PJc-9	PJc-10	PJc-11	PJc-12	PJc-13	PJc-14	PJc-15	PJc-S16
PJc-1	1.000															
PJc-2	0.931	1.000														
PJc-3	0.873	0.863	1.000													
PJc-4	0.833	0.882	0.843	1.000												
PJc-5	0.824	0.873	0.814	0.912	1.000											
PJc-6	0.775	0.804	0.765	0.824	0.794	1.000										
PJc-7	0.833	0.843	0.824	0.882	0.853	0.863	1.000									
PJc-8	0.853	0.882	0.824	0.863	0.833	0.824	0.863	1.000								
PJc-9	0.863	0.873	0.853	0.873	0.863	0.833	0.892	0.833	1.000							
PJc-10	0.814	0.843	0.765	0.824	0.794	0.745	0.745	0.843	0.755	1.000						
PJc-11	0.784	0.794	0.755	0.755	0.784	0.735	0.735	0.794	0.804	0.794	1.000					
PJc-12	0.775	0.784	0.745	0.824	0.794	0.745	0.745	0.765	0.794	0.784	0.696	1.000				
PJc-13	0.608	0.657	0.578	0.716	0.706	0.637	0.657	0.657	0.627	0.676	0.608	0.618	1.000			
PJc-14	0.765	0.794	0.716	0.775	0.784	0.716	0.735	0.755	0.725	0.755	0.706	0.716	0.725	1.000		
PJc-15	0.637	0.667	0.647	0.706	0.716	0.569	0.647	0.627	0.637	0.627	0.676	0.647	0.676	0.755	1.000	
PJc-16	0.843	0.814	0.814	0.775	0.784	0.716	0.755	0.794	0.784	0.755	0.745	0.755	0.588	0.706	0.578	1.000
PJc-17	0.804	0.833	0.814	0.794	0.804	0.696	0.755	0.794	0.804	0.735	0.745	0.775	0.549	0.706	0.618	0.863
PJc-18	0.843	0.853	0.814	0.833	0.824	0.755	0.794	0.833	0.843	0.775	0.745	0.755	0.627	0.706	0.637	0.843
PJc-19	0.706	0.696	0.716	0.735	0.725	0.657	0.716	0.676	0.706	0.637	0.647	0.696	0.627	0.706	0.676	0.745
PJc-20	0.755	0.745	0.745	0.745	0.735	0.667	0.745	0.745	0.775	0.667	0.716	0.686	0.578	0.637	0.647	0.755
PJc-21	0.627	0.598	0.618	0.598	0.588	0.618	0.637	0.618	0.627	0.500	0.569	0.598	0.510	0.529	0.520	0.627
PJc-22	0.637	0.627	0.647	0.647	0.637	0.569	0.627	0.627	0.676	0.569	0.598	0.647	0.529	0.539	0.549	0.735
PJc-23	0.647	0.657	0.637	0.637	0.667	0.598	0.657	0.618	0.686	0.559	0.588	0.637	0.510	0.569	0.539	0.745
PJc-24	0.627	0.598	0.618	0.578	0.608	0.578	0.618	0.578	0.667	0.480	0.608	0.578	0.529	0.588	0.559	0.627
PJc-25	0.755	0.804	0.745	0.765	0.775	0.706	0.725	0.725	0.814	0.686	0.716	0.725	0.637	0.637	0.588	0.716
PJc-26	0.814	0.804	0.784	0.784	0.814	0.745	0.784	0.745	0.833	0.706	0.735	0.745	0.578	0.676	0.608	0.814
PJc-27	0.696	0.686	0.647	0.706	0.676	0.716	0.686	0.667	0.755	0.627	0.618	0.667	0.559	0.598	0.471	0.657
PJc-28	0.755	0.765	0.725	0.784	0.755	0.745	0.765	0.725	0.814	0.667	0.676	0.706	0.637	0.618	0.549	0.735
PJc-29	0.843	0.853	0.775	0.794	0.804	0.735	0.775	0.775	0.843	0.735	0.745	0.755	0.608	0.706	0.637	0.765
PJc-30	0.794	0.784	0.765	0.745	0.735	0.725	0.745	0.745	0.833	0.686	0.716	0.725	0.598	0.637	0.608	0.755

PJc-17	1.000															
PJc-18	0.863	1.000														
PJc-19	0.784	0.804	1.000													
PJc-20	0.814	0.853	0.814	1.000												
PJc-21	0.647	0.667	0.686	0.735	1.000											
PJc-22	0.755	0.735	0.745	0.784	0.706	1.000										
PJc-23	0.765	0.725	0.706	0.775	0.667	0.833	1.000									
PJc-24	0.647	0.647	0.686	0.716	0.725	0.716	0.765	1.000								
PJc-25	0.794	0.794	0.716	0.784	0.657	0.647	0.676	0.696	1.000							
PJc-26	0.814	0.794	0.755	0.765	0.676	0.706	0.775	0.735	0.824	1.000						
PJc-27	0.657	0.716	0.618	0.686	0.657	0.588	0.598	0.657	0.745	0.765	1.000					
PJc-28	0.735	0.814	0.725	0.725	0.657	0.696	0.676	0.637	0.804	0.824	0.765	1.000				
PJc-29	0.804	0.863	0.745	0.794	0.667	0.696	0.706	0.667	0.873	0.873	0.775	0.833	1.000			
PJc-30	0.794	0.853	0.755	0.804	0.696	0.755	0.696	0.696	0.765	0.804	0.745	0.804	0.873	1.00		

## ANEXO A

Preparación de buffers y geles para la electroforesis de ADN.

### i. BUFFER DE RESOLUCIÓN STOCK TRIS-ACETATO (TAE) 50X

Reactivo	Cantidad	Concentración final
Tris base	242 g	1,9 M
Ácido acético glacial	571 ml	57,1%
EDTA 0,5M Ph8,0 1	100 ml	0,05 M

Enrrasar en 1L de agua bidestilada.

### ii. BUFFER DE MUESTRA PARA ADN (6X)

Reactivo	Cantidad	Concentración final
Azul de bromofenol	25 mg	0,25% w/v
Xilene cianol	25mg	0,25% w/v
Sucrosa	4g	40% w/v

Enrrasar en TAE 1X

### iii. AGAROSA 0,8%, 1,5% Y 2%

Disolver 0,8 g, 1,5 g ó 2 g de agarosa en 98 mL de agua bidestilada. Adicionar a la solución 2 mL de TAE 50X, homogeneizar y disolver la agarosa en horno microondas o en baño María.

### iv. SOLUCIÓN DE TRABAJO DE BROMURO DE ETIDIO (1 µg/mL)

Diluir 100 µL de bromuro de etidio a partir de la solución stock en 100 mL de agua bidestilada.

Forrar el recipiente con papel aluminio u otro que impida el paso de la luz.

## ANEXO B

Pautas para la introducción de la data en el programa NTSYS-pc

- v. NTSYS puede leer matrices de datos grabadas utilizando el programa EDIT del DOS, o cualquier procesador de textos, siempre y cuando se “salven” en modo texto, para nuestro análisis de cálculo la distancia entre otus en base a datos binarios.
- vi. El formato para la matriz básica de datos (MBD) se colocan los parámetros separados por un espacio en blanco: el primer número indica el tipo de matriz (1= MBD, 2 y 3 matrices de disimilitud o similitud); el segundo, la cantidad de caracteres; el tercero, el número de OTU's.
- vii. Para obtener la Matriz de similitud distancia o correlación se debe usar el programa INTERVAL, el cual está dentro de (DIS) SIMILARITY MEASURES, se coloca el nombre de la matriz de datos sobre la cual se calcularán los valores de similitud en Name of input matrix. Se elige el coeficiente deseado y se da un nombre a la matriz que resultará del análisis (output matrix).
- viii. Para la creación del fenograma se elegir el programa SAHN clustering (sección CLUSTER AND GRAPH METHODS), en name of input matrix se colocará el nombre de la matriz de similitud y en name of output matrix, el nombre del archivo con que se grabará el fenograma; la opción method permite cambiar el tipo de ligamiento a utilizar.
- ix. El coeficiente de correlación cofenética, se tiene que clacular una matriz cofenética a partir del fenograma obtenido previamente, se debe elegir el programa COPENETIC VALUES (sección CLUSTER AND GRAPH METHODS). En tree matrix se colocará el

nombre que se le dio al archivo del fenograma y en copenetic matrix el nombre que se dará a la matriz cofenética, paso seguido se ingresa al programa MATRIX COMPARISON (sección GRAPHICS). Donde se comparan la matriz de similitud a partir de la cual se obtuvo el fenograma (input matrix x) y la matriz cofenética (input matrix y), se obtiene el valor r que indica el grado de distorsión del fenograma.

- x. El análisis de coordenadas principales: se ejecuta en el siguiente orden :

Con la matriz obtenida inicialmente de distancias entre OTU's se obtiene un la result matrix mediante el programa DOBLE CENTER, Una vez dentro de este programa se debe completar el nombre de la data matrix, que corresponde a la matriz de similitud y el de la result matrix . Finalmente se calcula los eigenvector matrix y de la eigenvalue matrix, programa MATRIX PLOT (sección GRAPHICS) se emplea para obtener el gráfico bidimensional de coordenadas principales. La matriz que pide este programa como input es la de eigenvectores obtenida en el paso anterior

# GLOSARIO

- **Accesión:** Muestra de un cultivo recolectada en una localidad y en un tiempo específicos.
- **ADN:** Acido desoxirribonucleico, compuesto por nucleótidos de doble cadena unidos entre sí. Es la molécula fundamental en la transmisión de los genes.
- **ADN polimerasa ( taq polimerasa):** Enzima capaz de sintetizar nuevas cadenas de ADN a partir de un ADN molde.
- **AFLP's:** Siglas en ingles de Amplified Fragment Length Polymorphism, consiste en la combinación de los métodos de PCR y análisis de fragmentos de restricción, con el fin de detectar polimorfismos debidos a modificaciones en la secuencia de ADN que comprende los sitios de corte de las enzimas de restricción.
- **Alelo:** se denomina como una de las formas posibles de un gen.
- **Biodiesel:** combustible que se obtiene de los aceites vegetales o grasas de origen animal mediante procesos de esterificación y transesterificación.
- **Electroforesis:** Técnica que separa, biomoléculas (proteínas, ADN, ARN) según su tamaño, y peso molecular en un campo eléctrico por medio de un gel que sirve de soporte.
- **Enzima:** Proteína que funciona como catalizador de reacciones bioquímicas.
- **dNTPs (desoxinucleotidos):** Nucleótidos cuya pentosa es una desoxirribosa y por ende son los monómeros del ácido desoxirribonucleico (ADN).

- **Fenograma:** Dendrograma no enraizado que representa mediante líneas de jerarquía, categorías u objetos basada en el grado de semejanza o en el número de caracteres compartidos. La longitud de las líneas representa, a veces, la distancia que separa los dos objetos relacionados.
- **Fenotipo:** manifestación externa de los caracteres hereditarios determinados por el genotipo y el ambiente
- **Filogenética:** Se refiere en su sentido original a una clasificación que refleja la historia evolutiva de una especie o grupo, la filogenética es el estudio de esas relaciones evolutivas.
- **Germoplasma:** La variabilidad genética total disponible de una población de organismos representados por células germinales, semillas, etc.
- **Genoma.** Término utilizado para referirse a todos los genes (información genético) contenida en un solo gameto, es decir un representativo de cada cromosoma.
- **Genotipo:** Composición específica de alelos de toda la célula o, más comúnmente, de determinado gen o de un conjunto de genes.
- **Heterocigosis:** Proporción de loci heterocigóticos en animales cruzados comparados con los valores dentro de cada raza.
- **Heterocigosidad:** La proporción de individuos heterocigotos para un locus o en promedio para varios loci. Es un estimador de variabilidad genética en poblaciones naturales o domesticadas.
- **Heterocigosidad esperada:** Proporción de organismos heterocigotos calculada a partir del equilibrio de Hardy-Weinberg. Su cálculo implica la obtención de las frecuencias genotípicas a partir de las frecuencias alélicas siguiendo un binomio al cuadrado  $(p + q)^2$ , en donde p y q

son las frecuencias alélicas y  $2pq$  corresponderá a la frecuencia de heterocigotos.

- **Heterocigosidad observada:** Proporción de organismos heterocigotos calculada a partir de los genotipos observados en una muestra poblacional.
- **Heterocigoto:** Un individuo diploide o poliploide que ha heredado diferentes alelos en uno o más de sus loci.
- **Homocigoto:** Un individuo que ha heredado el mismo alelo de ambos padres para un determinado locus.
- **ISSR:** Secuencia entre repeticiones simples. Los cebadores de la ISSR quedan anclados en sus extremos 3' para dirigir la amplificación de los segmentos genómicos entre los ISSR.
- ***Jatropha curcas*:** Planta de porte arbustivo perteneciente al grupo de las euforbiáceas, originaria de Centroamérica cultivada desde tiempos precolombinos en el Perú, es un árbol pequeño, caducifolio, de hasta ocho metros de altura, crece en climas tropicales aunque tolera suelos infértiles. De gran interés comercial para la producción de biodiesel.
- **Marcador Molecular:** Ubicación física identificable en un cromosoma cuya herencia puede rastrearse, sirve para identificar a un individuo o alguna de sus características.
- **Marcador de peso molecular:** determina la concentración del ADN durante la electroforesis.
- **Microsatellite:** secuencias de nucleótidos de ADN en las que un fragmento hasta de 6 nucleótidos se repite constantemente.
- **Locus:** Plural de loci, se refiere a una posición fija sobre un cromosoma, como la posición de un gen o de un marcador genético.

- **PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa. Método para amplificar una secuencia de ADN en grandes cantidades mediante una polimerasa estable al calor y con cebadores apropiados, los cuales dirigen la amplificación de la región del ADN que interesa.
- **Polimorfismo:** La existencia de múltiples alelos de un gen presentes en una población, normalmente expresados como diferentes fenotipos, que aparecen en una frecuencia significativa de al menos en un uno de cada cien en una población.
- **Primer o cebador:** Fragmento corto de ADN o de ARN hibridado con un ADN de cadena simple, y al cual pueden agregarse más nucleótidos mediante la polimerasade ADN
- **RAPD:** Polimorfismo de ADN amplificado al azar. Técnica que amplifica tramos anónimos de ADN empleando la PCR con cebadores arbitrarios.
- **RFLPs (Restriction Fragment Length polymorphism):** Polimorfismo de la longitud de Fragmentos de Restricción. Técnica en la que originalmente se digería el ADN genómico con enzimas de restricción para posteriormente transferir a unamembrana (Southern blotting) e hibridar con una sonda conocida (ej. minisatelite). Actualmente, existe una variante en la que primeramente se amplifican por PCR regiones conocidas, comúnmente de ADN mitocondrial, y posteriormente se digieren con enzimas de restricción, evaluando el polimorfismo en cuanto al largo de los fragmentos generados.
- **Temperatura de fusión (Tm):** Punto medio del intervalo de temperaturas al cual el ADN se desnaturaliza.
- **Variabilidad genética:** se refiere a la variación hereditaria dentro y entre poblaciones de organismos, cuya base está en los cromosomas (ADN) y puede ser manipulada por la tecnología tradicional y moderna (biotecnología, ingeniería genética, etc).

- **VNTR (del inglés Variable Number of Tandem Repeats):** Número variable de repeticiones en tándem. Término genérico para denotar a las secuencias repetidas en tándem de 1 a 100 pb, incluye las regiones microsatelite y minisatelite.