

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN AGUSTÍN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA**



**EVALUACIÓN DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA DE LA CASTAÑA
Bertholletia excelsa EN LA REGIÓN DE MADRE DE DIOS, MEDIANTE
MARCADORES MICROSATÉLITES**

Tesis presentada por la bachiller
EVELYN GABRIELA REÁTEGUI ZIRENA
Para optar el título profesional de bióloga

**AREQUIPA – PERÚ
2010**

A Dios. A mi familia: Any,
Keneth, Hanny y Mely, que
son el motor de mi vida.

AGRADECIMIENTOS

Mi gratitud incondicional a todas y cada una de las personas que han colaborado en la realización de esta tesis.

Al Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana - IIAP e INCAGRO por haber apoyado y financiado la presente tesis.

A mis asesores, Herbert Lazo Rodríguez, Dra. Carmen Rosa García Dávila y Dr. Jean-François Renno, por su amabilidad y su apoyo, tanto profesional como personal.

A Fernando Carvajal, por los consejos en la práctica de laboratorio y la amistad mostrada.

A mis amigos de laboratorio: Ángel Martín, José Luis, Werner, Diana, Mike, Javier, Adriana, Jorge, Karin, Claudia, Elías, con los que compartí muchas horas de trabajo e ilusiones y que siempre estuvieron a mi lado para brindarme su ayuda desinteresada. Mi gratitud por los buenos momentos, por su entusiasmo y amistad.

ÍNDICE DE CONTENIDO

	Pag.
LISTA DE ABREVIATURAS	05
RESUMEN	06
INTRODUCCIÓN	07
OBJETIVOS	10
CAPITULO I	
MARCO TEÓRICO	11
CAPITULO II	
MATERIAL Y METODOS	28
CAPITULO III	
RESULTADOS	41
CAPITULO IV	
DISCUSIÓN	54
CONCLUSIONES	60
RECOMENDACIONES	61
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62
ANEXOS	70

LISTA DE ABREVIATURAS

A	:	Número de alelos
ADN	:	Ácido desoxirribonucleico
AFC	:	Análisis Factorial de Correspondencia
A_R	:	Media de número de alelos
A_T	:	Número total de alelos
CTAB	:	Bromuro de Cetil Trimetil Amonio
dNTP's	:	Desoxinucleótidos trifosfatos
EDTA	:	Ácido Etileno Diamino Tetra acético
FD	:	Factor de Dilución
F_{IS}	:	Coefficiente de endogamia
F_{ST}	:	Índice de fijación
H2O mili-Q	:	Agua ultrapura: destilada, ultrafiltrada, autoclavada
H_o	:	Heterocigosidad observada
H_e	:	Heterocigosidad esperada
MgCl ₂	:	Cloruro de Magnesio
NaCl	:	Cloruro de Sodio
N_m	:	Número de migrantes
PCR	:	Reacción en Cadena de la Polimerasa
Pb	:	Pares de bases
PIC	:	Contenido de información polimórfica
pH	:	Potencial de Hidrógeno
rpm	:	Revoluciones por minuto
R_{ST}	:	Estimador de diferenciación específica de microsatélites
SSR	:	Secuencias Simples Repetidas
TBE	:	Tris Borato EDTA
Tris Base	:	Tris Hidroximetil Amino Metano
Taq	:	Thermus aquaticus Enzima termoestable
UPGMA	:	Unweighted Pair-Group Method with the Arithmetic Averaging
Vis/UV	:	Luz ultravioleta visible

RESUMEN

La especie *Bertholletia excelsa* “castaña” es un producto forestal no maderable con gran potencial económico en la Amazonía peruana y una alternativa para la extracción forestal. El presente estudio pretende contribuir al conocimiento genético de esta especie, a través del análisis de su variabilidad genética en poblaciones naturales del departamento de Madre de Dios. Para lo cual se colectaron un total de 164 muestras de árboles de castaña, las cuales fueron evaluadas con seis *loci* microsátélites. Todos los *loci* microsátélites resultaron polimórficos, reportándose un total de 47 alelos, con una media de 7.83. En términos generales, las poblaciones muestreadas presentan una amplia variabilidad genética intrapoblacional, siendo Valencia y Pampa Hermosa las que presentaron la mayor riqueza alélica ($A_R = 5.83$) y Pariamanu la menor ($A_R = 5.17$), la heterocigocidad observada y esperada presentaron poca diferencia entre las poblaciones. Los resultados de AFC, SAMOVA (98.06% de la variación se encuentra dentro de las localidades y solo 2.24% entre ellas) y distancia genética (Distancia promedio = 0.017), mostraron que las siete localidades evaluadas presentan poca diferenciación genética entre ellas; es decir las poblaciones no están aisladas, presentado un elevado flujo genético demostrado en los resultados de Nm que variaron del infinito a 6.26. Sin embargo los resultados globales de F_{ST} (0.024), R_{ST} (0.045) muestran una débil diferenciación genética entre ellas. El dendrograma elaborado en base a la distancia genética muestra que las siete localidades se encuentran conformando cuatro agrupaciones de las cuales Muymanu resultó ser la más lejana. Los resultados obtenidos tanto a nivel intrapoblacional como entre las poblaciones puede ser atribuidos a las escasas barreras físicas entre las localidades, y las pequeñas diferenciaciones entre algunas poblaciones y las relaciones genéticas entre ellas, a la presencia de ríos entre las agrupaciones que por un lado presenta márgenes inundables que son inadecuadas para plantas de tierra firme como la castaña; y por el otro, los ríos constituyen barreras insuperables para dispersores como los roedores.

INTRODUCCIÓN

Los marcadores moleculares de ADN constituyen la nueva generación de marcadores, que han tenido un gran impacto en el estudio de la genética de animales y plantas (Azofeifa-Delgado, 2006). Su aplicación para la resolución de problemas en la conservación de recursos está en desarrollo y requiere una extensiva colaboración entre los conservacionistas y los biólogos moleculares. En este sentido los marcadores moleculares son valiosas herramientas para la evaluación del estado de conservación genética de las especies, porque permite determinar la variabilidad genética, el flujo de genes y otros parámetros poblacionales. La importancia de estos marcadores radica en que ofrecen la posibilidad de estudiar poblaciones de organismos y seleccionar aquellos que presentan rasgos de interés para el hombre (Karp *et al.*, 1997). Este es el caso de la castaña que se encuentra en poblaciones naturales en la Amazonía peruana y actualmente no existen reportes en la literatura científica sobre su variabilidad genética. Desconociéndose el estado de conservación de estos pool genéticos que son fundamentales para la supervivencia, futura evolución, así como una fuente potencial para futuros planes de mejoramiento genético de la especie (Kanashiro *et al.*, 1997).

La Amazonía peruana presenta una extensión de 756,866 km² y constituye la décima parte de todos los bosques del mundo (Kalliola *et al.*, 1993). El departamento de Madre de Dios se encuentra ubicado en el sur-oriental peruano, abarca tanto selva alta como selva baja y se caracteriza por presentar un clima tropical cálido y húmedo. Este departamento está formado principalmente por llanuras aluviales con terrazas de tres hasta cuatro niveles. De las cuales las más bajas están sometidas a inundaciones anuales y son generalmente pantanosas (Lawrence *et al.*, 2005). La transición entre selva alta y baja (ecotono) hace que esta región posea una gran biodiversidad de flora y fauna que abren potencialidades económicas diversas. Sin embargo, muchas de ellas impactan negativamente sobre el ambiente.

Razón por la cual, diferentes instituciones amazónicas vienen investigando otras fuentes económicas menos impactantes, promoviéndose actividades económicas sostenibles como el cultivo de productos no maderables entre otros; que generen por un lado un adecuado ingreso económico para la gente local y por el otro la preservación de los ecosistemas tropicales, con mínima perturbación del ecosistema natural (Ramírez, 2006; Moegenburg y Levey, 2002; Zuidema y Boot, 2002; Camargo *et al.*, 1994). Una alternativa para evitar la deforestación es la "castaña" *Bertholletia excelsa* (Humboldt & Bonpland, 1808), especie con potencial económico en esta región de la amazonía peruana, debido primero a que presenta frutos cuyas semillas poseen alto contenido de selenio (ayuda a detener los procesos degenerativos de las células cancerígenas); y segundo que posee un desarrollo agronómico y tecnológico ya establecido (Pastor, 2004; Thomson *et al.*, 2008).

En el Perú esta especie presenta sus mayores poblaciones naturales en la región de Madre de Dios, con una extensión aproximada de 2 500 000 hectáreas, de las cuales 1 600 000 son aprovechadas como áreas de recolección. Generando un gran potencial económico (8 millones de dólares y 2,500 toneladas de castaña en promedio como exportación anual). Por lo cual esta actividad es de vital importancia para la región, ya que alrededor

del 25% de la población (aproximadamente 20.000 habitantes) dependen directa e indirectamente de esta actividad (INRENA, 2003).

Por las bondades antes descritas, en los últimos años la región de Madre de Dios ha presentado un acelerado crecimiento económico. Que si bien ha contribuido al mejoramiento en el nivel de vida de su población, ha causado una corriente migratoria hacia la zona, originando la creación de nuevos asentamientos humanos. Los cuales, ejercen una fuerte presión sobre los recursos naturales del bosque, convirtiendo áreas forestales en nuevas áreas de cultivos agropecuarios, causando con esto una inminente deforestación. Estudios forestales realizados en esta especie endémica para la región amazónica, muestran una constante disminución en sus poblaciones naturales debido a este problema (Motta, 2002; Wickens, 1995).

En ese sentido el presente estudio tuvo por objetivo utilizar los marcadores moleculares microsatélites o SSR (Simple Sequence Repeats) para la evaluación de la variabilidad genética de la castaña en poblaciones naturales de la región de Madre de Dios, en busca de generar información que sirva de base para futuros planes de conservación y manejo sostenido, así como de mejoramiento genético de la especie.

OBJETIVOS

Objetivo general:

- Evaluar la variabilidad genética de *Bertholletia excelsa* “Castaña” en siete localidades de la región de Madre de Dios utilizando marcadores microsatélites.

Objetivos específicos:

- Determinar la variación alélica (A , H_o , H_e , F_{IS} , PIC, alelos nulos y privados) de cada microsatélite utilizado.
- Determinar la variabilidad genética intrapoblacional (N_a , H_o , H_e , F_{IS} , A_T , A_R) e interpoblacional (AFC, F_{ST} , R_{ST} , Nm , SAMOVA) de la castaña de la región de Madre de Dios.
- Estimar la correlación entre la distancia genética y la distancia geográfica (coeficiente de Pearson).
- Determinar las relaciones interpoblacionales entre las siete localidades estudiadas (dendrograma UPGMA).

CAPITULO 1

MARCO TEÓRICO

Muchos avances en genética molecular han incrementado el impacto de la genética de poblaciones en las ciencias biológicas. Uno de los más importantes ha sido, el desarrollo de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), tecnología utilizada para multiplicar (sintetizar) in vitro fragmentos específicos de ADN con la finalidad de detectar una secuencia o gen de interés en el genoma del individuo en estudio. Asimismo, el descubrimiento de loci microsatélites muy variables y finalmente, la rutina de secuenciamiento de ADN en laboratorios, nos ayuda a responder preguntas biológicas de evolución, poblaciones y conservación más eficientemente (Sunnucks, 2000).

1.1 Marcadores moleculares

La genética molecular tiene un importante rol en muchos aspectos de la conservación, tales como la caracterización de la diversidad fitogenética. Con el desarrollo de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) numerosas técnicas han sido y están siendo desarrolladas para la detección, caracterización y evaluación de la

diversidad genética. Como son los marcadores moleculares que funcionan como señaladores de diferentes regiones del genoma. La secuencia nucleotídica y la función de los marcadores moleculares por lo general son desconocidas; pero cuando su comportamiento se ajusta a las leyes básicas de la herencia mendeliana, este es definido como marcador genético. Los marcadores del ADN se basan fundamentalmente en el análisis de las diferencias en pequeñas secuencias del ADN entre individuos.

Dichos marcadores son completamente independientes de las condiciones externas. Además, los marcadores moleculares pueden ser analizados en distintos tejidos y en diferentes estadios de desarrollo de la planta. Un marcador molecular monomórfico es invariable en todos los organismos estudiados, pero cuando presenta diferencias en el peso molecular, actividad enzimática, estructura, o sitios de restricción, se dice que es polimórfico. Este tipo de marcadores, especialmente en el caso de los isoenzimas y los marcadores de ADN, han demostrado niveles de polimorfismo considerables y han sido de gran utilidad para los estudios de identificación de plantas y animales.

Hoy en día, los marcadores agronómicos, morfológicos y moleculares se utilizan conjuntamente para conseguir una evaluación completa de los recursos genéticos. (Azofeifa-Delgado, 2006; Ferreira y Grattapaglia, 1998)

1.2 Microsatélites

Microsatélites o secuencias simples repetidas (SSR) (Simple Sequence Repeat) o STRs (Short Tandem Repeat), son regiones de secuencias pequeñas (2 a 10 pares de bases) repetidas, arregladas en serie, distribuidas azorosamente en todo el ADN. Son abundantes,

neutros y poseen una alta tasa de mutación que los hace muy polimórficos. La tasa de mutación en los microsatélites ha sido estimada en un rango que oscila entre 10^{-3} y 10^{-5} mutaciones por gameto (Araguren-Méndez *et al.*, 2005). El polimorfismo en la longitud del fragmento amplificado refleja la existencia de variaciones en el número de veces que se encuentra repetido el motivo que origina el microsatélite. Esta característica es una de las diferencias más importantes entre los microsatélites y otros marcadores como las isoenzimas, polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP), amplificación aleatoria del ADN polimórfico (RAPD) y polimorfismo en la longitud de los fragmentos amplificados (AFLP). También son codominantes, es decir que en cada locus un individuo podría presentar uno o más alelos, dependiendo del número de juegos de cromosomas que posea. Por ejemplo, los humanos somos diploides, es decir, poseemos dos juegos completos de cromosomas y por lo tanto para un locus microsatélite podemos presentar un alelo (si ambos progenitores nos transmitieron alelos de la misma secuencia y tamaño) o dos alelos (si cada progenitor nos heredó un alelo de tamaño diferente). Cada SSR examina una sola porción del genoma y por lo tanto se requiere de varios de ellos para hacer una estimación válida. Su desarrollo es muy laborioso debido a que deben identificarse y secuenciarse regiones genómicas concretas. Sin embargo, una vez obtenidos la metodología del análisis por SSRs es relativamente sencilla. Además, el análisis requiere solamente una cantidad escasa de ADN (Azofeifa-Delgado, 2006; Karp *et al.*, 1997).

1.2.1 Constitución

Un microsatélite está típicamente conformado por un motivo repetitivo, en el cual se encuentra contenido la secuencia repetida (por ejemplo: AGAGAGAGAGAGAG), y dos regiones flanqueantes, las cuales se encuentran a ambos lados del motivo repetitivo. Sin

embargo en algunos casos, puede haber dos motivos repetitivos o más dentro de un microsatélite. (por ejemplo: CTCTCTCTGTGTGT). Para que un microsatélite sea considerado útil como marcador molecular, toda la variación de la secuencia o polimorfismo debe hallarse dentro del motivo repetitivo, y por el contrario, las regiones flanqueantes deben estar altamente conservadas al punto de no presentar ninguna variación de secuencia (Hancock, 1999).

Partiendo de esta premisa se diseñan *primers* o iniciadores (también llamados cebadores) es decir, fragmentos de ADN que tienen la misma secuencia que los extremos de las regiones flanqueantes para poder amplificar (o producir un alto número de copias) un microsatélite a través de una PCR.

Los fragmentos producidos son separados de acuerdo a su longitud en pares de bases a través de una electroforesis en gel de agarosa. Partiendo de la hipótesis de que en un microsatélite sólo varía el número de repeticiones dentro del motivo repetitivo; fragmentos que tienen el mismo tamaño, tienen la misma secuencia, de manera que todos los fragmentos de un mismo tamaño representarían un alelo (Figura 1) (Ferreira y Grattapaglia, 1998).

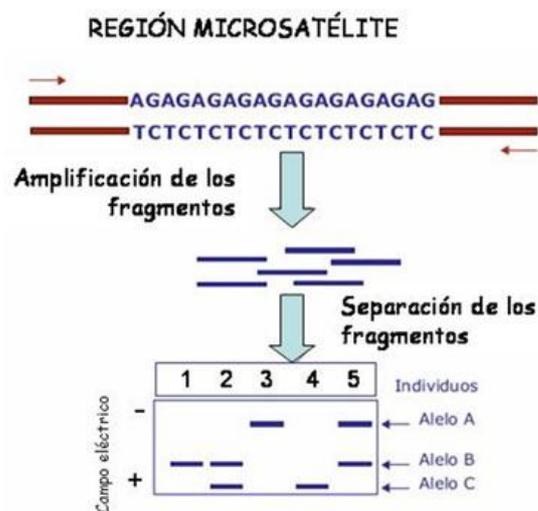


Figura 1.- Representación gráfica de la región microsatélite

1.2.2 Clasificación

Los microsatélites se clasifican de acuerdo al número de nucleótidos que posea el motivo de repetición como: mono, di, tri, tetra, penta o hexanucleótido.

La clasificación también incluye el patrón de orden de los motivos:

- **Puro o perfecto:** Un solo motivo repetido “n” veces en serie. Ejemplo: $(AC)_9$
- **Puro interrumpido:** Un solo motivo repetido “n” veces, donde se intercalan nucleótidos entre las distintas repeticiones. Ejemplo: $(CA)_2AA(CA)_{12}$
- **Compuestos:** Dos o más motivos repetidos en serie. Ejemplo: $(GT)_2(TG)_{10}$
- **Compuestos interrumpidos:** Al menos uno de sus motivos presenta nucleótidos intercalados. Ejemplo: $(CT)_4(GT)_2CTAT(GT)_{15}$
- **Complejos:** Combinaciones entre cualquiera de las clases anteriores, sin ningún patrón de orden definido. Ejemplo: $(ACC)_8+TG+(GA)_{12}+(TTA)_5+GC+(TTA)_4$

1.2.3 Utilización

En los últimos años los microsatélites han sido la herramienta más utilizada para estudiar distintos aspectos de interés, como son el éxito reproductivo, la estructura social y el parentesco entre individuos. Los usos más frecuentes corresponden a la estimación de la diversidad genética intra e inter poblacional, sea en especies cultivadas o silvestres, en el desarrollo de mapas de ligamiento, para estudio de las relaciones filogenéticas entre especies, también como herramienta para determinar la mejor estrategia de conservación de recursos genéticos por ejemplo en la formación de colecciones nucleares, en la

identificación de duplicados, entre otros. Son la principal herramienta utilizada en microorganismos, plantas y animales para: caracterización de germoplasma identificación de genotipos, determinación de pureza, análisis de diversidad genética, mejoramiento genético, aislamiento y caracterización de genes específicos para usar en transformación genética y construcción de mapas de ligamiento (Azofeifa-Delgado, 2006; Borrell *et al.*, 2002).

Debido a su alto grado de variabilidad las secuencias de microsatélites son especialmente adecuadas para distinguir genotipos bastante relacionados. Son por lo tanto, favorables para estudios poblacionales y la identificación de variedades (Karp *et al.*, 2001). Como en el té japonés (Ohsako, *et al.*, 2008), el arroz (Arnao, *et al.* 2007), el pino salgareño (Jiménez, *et al.*, 2005) y el eucalipto (Jones *et al.*, 2001).

Las principales áreas en que se están aplicando los marcadores microsatélites en árboles forestales incluyen estudios de diversidad genética en poblaciones naturales y mejoradas, particularmente en especies con bajos niveles de variación de isoenzimas, flujo de genes, dispersión de pólen o semillas y sistemas de cruzamiento. Como estos parámetros son importantes para la conservación de los recursos genéticos forestales, los microsatélites se están utilizando para vigilar los efectos genéticos de los sistemas de ordenación forestal y de la fragmentación del bosque. En los programas de domesticación, pueden emplearse los microsatélites para la identificación del germoplasma y para ayudar a la construcción de mapas de ligamiento genético, con el objetivo final de lograr una selección asistida por marcadores.

1.2.4 Modelos de evolución

Muy poco se sabe sobre los mecanismos de evolución de estos marcadores. Tres modelos son discutidos: IAM (Infinite Allele Model) (Kimura y Crow, 1964) o modelo de alelo infinito que considera que las mutaciones en las secuencias de microsatélites resulta en la pérdida o ganancia de una o mas unidades de repetición de forma que cada mutación resulta en un nuevo alelo de forma aleatoria, las estadísticas de F están basadas en este modelo. SMM (Stepwise Mutation Model) o modelo de mutación gradual en pasos, en el que una mutación en un determinado alelo se da por la ganancia o pérdida de una unidad de repetición cada vez. Los alelos de igual o de tamaños próximos son genéticamente más próximos entre sí. Este modelo es más adecuado para microsatélites. El índice de diferenciación genética R_{st} (Slatkin, 1994) está basado en este modelo. Finalmente TPM (Two Phase Model), o modelo de dos fases, basado en la teoría de coalescencia y asume diferentes procesos mutacionales e historia demográfica en la estimación de la varianza en el número de repeticiones de un microsatélite. Este modelo es una extensión del modelo SMM, entonces asume no solamente que las mutaciones de mayores magnitudes pueden ocurrir sino que también pueden ser originadas a partir de uno o muchos pasos mutacionales (Estoup *et al.*, 2002). Sin embargo, ninguno de estos modelos parece encajar perfectamente con todos los microsatélites, consecuentemente, los estimadores de diferenciación (estadísticos F) y los estimadores de diferenciación específica de microsatélites (estadísticos R) son reportados en estudios usando marcadores microsatélites (Balloux y Lugon-Moulini, 2002).

1.2.5 Alelos nulos

Algunos factores pueden disminuir el poder y la sensibilidad de los microsatélites como marcadores de elección o pueden ser fuente de error que disminuya su utilidad en los estudios genéticos, en estos casos se habla de alelos nulos. Un alelo nulo es cuando un alelo no puede ser amplificado, debido generalmente a mutaciones en las secuencias que flanquean la región microsatélite, las cuales sirven como sitio de unión a los partidores diseñados para producir la amplificación por PCR. De esta forma, un genotipo heterocigoto puede ser registrado erróneamente como un individuo homocigoto al no amplificar uno de sus dos alelos (Pemberton *et al.*, 1995).

1.3 Estructura genética de poblaciones.

Las poblaciones naturales pueden estar definidas como un grupo de individuos que comparte un mismo *pool* de genes. La estructura genética de una población natural es la consecuencia de los rasgos de vida, los cuales están determinados por los procesos asociados al nacimiento, muerte y dispersión, incluyendo el sistema de reproducción (Slatkin, 1994). Estos procesos son considerados como factores intrínsecos, sin embargo, también pueden estar influenciados por la naturaleza física de los hábitats (factores extrínsecos), como la presencia de insectos polinizadores, animales dispersores de semillas, barreras naturales, distancia geográfica, etc. Es por eso que en muchas poblaciones naturales se espera que haya una gran estructuración genética debido a las barreras de dispersión que previenen los cruces aleatorios, así como también en otras poblaciones no existe una estructura genética debido a un flujo genético continuo.

1.4 Factores que determinan la estructuración genética.

1.4.1 Deriva Genética

La deriva genética ocurre en poblaciones relativamente pequeñas donde algunos alelos pueden cambiar su frecuencia simplemente debido al azar. La mayoría de los organismos son diploides, es decir, tienen dos ejemplares de cada gen. Los gametos de estos organismos portan solo uno de los dos ejemplares (alelos) de cada gen. El que un gameto lleve un alelo u otro es una cuestión de azar, por lo que la formación de gametos y su consiguiente unión para formar los cigotos de la siguiente generación solo puede describirse como un proceso probabilístico. En cada generación esperamos una fluctuación al azar de las frecuencias alélicas en las poblaciones. Si en algún momento durante esta conducta fluctuante uno de los alelos no llega a transmitirse a la siguiente generación, entonces este alelo se habrá perdido para siempre. El resultado de la deriva suele ser la pérdida de variabilidad genética, siendo un proceso que contrarresta la entrada de variabilidad genética por mutaciones. Es necesario mencionar que la deriva genética tiende a formar una población homocigótica, es decir, tiende a eliminar los genotipos heterocigóticos (Galtier *et al.*, 2000).

1.4.2 Selección natural

Es la fuerza creativa que lleva al proceso de adaptación de los organismos al compaginar cambios en su entorno físico y biológico. La selección natural resulta en una “descendencia con modificación”, mientras el genotipo provee la parte heredable, la selección actúa sobre el fenotipo (forma visible), esto incluye el desarrollo, morfología y comportamiento. La idea de la selección natural como un proceso fundamental de los cambios evolutivos fue iniciada por Charles

Darwin y Alfred Russel Wallace (Ayala y Kiger, 1984) e implica que las poblaciones naturales estén constituidas por un pool genético con algunas variantes poco frecuentes (Futuyma, 1986). El entorno es *crucial* para la selección natural, dado que sus límites son los que determinan que caracteres son los beneficiosos y dentro de ello, los cambios tanto en espacio como tiempo traen consigo modificaciones en los caracteres de los organismos.

1.4.3 Mutación

Ocasionalmente pueden llegar a producirse errores en la replicación del ADN, estos cambios son denominados mutaciones. Una mutación es un cambio estable y heredable en el material genético. Las mutaciones alteran la secuencia del ADN y por tanto introducen nuevas variantes. Muchas de éstas variantes pueden ser eliminadas, pero ocasionalmente algunas de éstas variantes pueden tener éxito e incorporarse en todos los individuos de la especie. La mutación es un factor que aumenta la diversidad genética. Una alta tasa de mutación implica un mayor potencial de adaptación en el caso de un cambio ambiental, pues permite explorar más variantes genéticas, aumentando la probabilidad de obtener la variante adecuada necesaria para adaptarse al ambiente. A su vez, una alta tasa de mutación aumenta el número de mutaciones perjudiciales o deletéreas de los individuos, haciéndolos menos adaptados, y aumentando la probabilidad de extinción de la especie. Las mutaciones no tienen ninguna dirección respecto a la adaptación, son como un cambio al azar. Este cambio puede producir una falta de significado, y por eso la mayoría de las mutaciones son deletéreas. Pero a veces, ciertos cambios pueden introducir nuevos significados, permitiendo nuevas funciones. (Araguren-Méndez *et al.*, 2005).

1.4.4 Flujo genético

El flujo genético se define como la transferencia de material genético entre poblaciones dado por el movimiento de individuos o de sus gametos (Avise y Hamrick, 1996). El impacto del flujo de genes está determinado por la capacidad de dispersión de la especie, así como por barreras geográficas, distancias y estructura poblacional (Orell *et al.*, 1999). El flujo genético es un componente principal de la estructura poblacional porque determina hasta que punto cada población local de una especie es una unidad evolutiva independiente. Si existe una gran cantidad de flujo genético entre poblaciones locales, entonces todas las poblaciones evolucionan juntas; pero si hay poco flujo genético cada población evoluciona en forma casi independiente (Slatkin, 1994).

1.5 Características de la castaña *Bertholletia excelsa*

1.5.1 Ubicación sistemática

Reino	:	Plantae
Filo	:	Magnoliophyta
Clase	:	Magnoliopsida
Orden	:	Lecythidales
Familia	:	Lecythidaceae
Género	:	<i>Bertholletia</i>
Especie	:	<i>B. excelsa</i> (Hunb. & Bonpl.)

1.5.2 Descripción taxonómica

Bertholletia excelsa pertenece a una familia pantropical de árboles (Lecythidaceae) que incluye aproximadamente 200 especies en los Neotrópicos (Mori, 1992).

Es uno de los árboles más grandes de la amazonía, de 30 a 50 m de altura y una copa de 10 a 20 m de diámetro, fuste recto, cilíndrico, desprovisto de ramas hasta la copa, la corteza es oscura y hendida. (Kainer *et al.*, 1998). Hojas deciduas, de tomento suave y lámina cartáceo-coriácea, con 25 a 35 cm de longitud y 8 a 12 cm de ancho, oblongas o elíptico-oblongas, base aguda, ápice obtuso-redondeado y ligeramente acuminado, márgenes ondulados. Se encuentran dispuestas alternativamente en las ramas (Figura 2) (Corvera y Arcos, 2006).



Figura 2.- Árboles de *Bertholletia excelsa* “castaña” de la región de Madre de Dios.

La especie posee inflorescencias espiciformes, axilar o en panículas terminales, de pocas ramas, erectas. Las flores son zigomorfas, con dos o tres sépalos y seis pétalos amarillos, ovario ínfero, tetralocular o tentacular, lóculos generalmente con cuatro o seis óvulos. Los estambres están fusionados en su base que se prolonga hacia un

lado formando una lígula. La combinación de pétalos blancos y el amarillo esta restringido al margen interno y apéndices de la lígula, atrae polinizadores por diferentes combinaciones atractivos secundarios (color y olor) y primarios (polen y néctar) (Mori, 1995 y 1992).

El fruto es una cápsula de tipo pixidio incompleto, llamado “coco”. Es esférico o ligeramente achatado, con cáscara dura y leñosa, el ápice del fruto con una región diferenciada, en cuyo centro se encuentra un orificio de 1 cm. de diámetro, correspondiendo al opérculo, epicarpio lenticelado, verrucoso, pardo oscuro, mesocarpio duro, leñoso, semillas en número de 10 a 25, angulares, con dos lados planos y uno cóncavo, de 3 a 5 cm. de largo y 4 a 10 gr. de peso, cubierta rugosa, dura y leñosa, testa delgada y de color marrón, la almendra o semilla es blanca comestible. El fruto pesa entre 500 y 1 500 gr y contiene entre 15 y 24 castañas o semillas (Figura 3, A, B, C) (Peres y Baider, 1997b).



Figura 3.- A) Fruto cerrado; B) Fruto abierto; C) Semillas de castaña

1.5.3 Distribución

Es una especie originaria del sur-este amazónico, distribuida en la cuenca amazónica en Bolivia, Brasil, Colombia, Perú, Venezuela, Guyana y Surinam. (Wickens, 1995) (Figura 3). La población de castaña se presenta en densidades muy variantes. A gran escala, los arboles de castaña se encuentran en manchas o manchales. Los arboles se distribuyen al azar (Peres y Baidier, 1997).

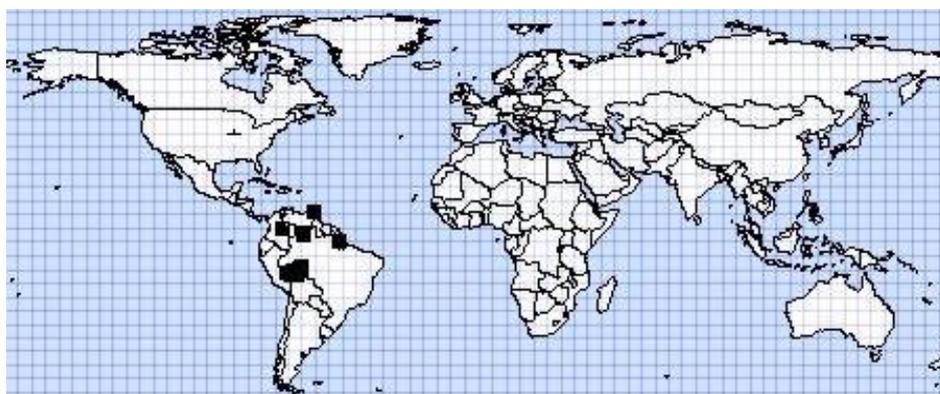


Figura 3.- Distribución de castaña *Bertholletia excelsa* en el mundo.

1.5.4 Ecología

La castaña se desarrolla bien en regiones de clima cálido y húmedo. La temperatura media anual varía de 24.3 a 27.2° C. (Wickens, 1995). La precipitación total anual varía entre 1400 y 2800 mm. La humedad relativa anual media se sitúa en el rango de 79 a 86%. Próspera en terrenos no inundados (terra firme), ricos en materia orgánica (Kainer *et al.*, 1998; Mori, 1992). En las áreas de castañales nativos, los suelos son arcillosos o arcillo-arenosos, con pH entre 4.5 y 6.0 (Corvera y Arcos, 2006).

Generalmente, se necesitan 15 meses para que las semillas maduren; consecuentemente, los frutos caen principalmente en enero y febrero, durante la estación lluviosa. La dispersión primaria para la

castaña ocurre por el efecto de la gravedad, los frutos caen al suelo del bosque sin sufrir un daño mayor por el impacto de la caída al estar completamente cerrados. Como los frutos son numerosos y contienen una gran cantidad de semillas, deben contar con una apertura asistida del fruto. Las semillas son dispersadas por roedores, principalmente por especies de agouti (*Dasyprocta* spp.) y por ardillas (*Sciurus spadiceus*) que son capaces de romper eficientemente el pericarpo del fruto, ocasionalmente monos capuchinos marrones (*Cebus apella*) (Motta, 2002; Peres *et al.*, 1997a). La parte comestible es el hipocótilo porque los cotiledones están atrofiados. Los animales comen y destruyen muchas de las semillas, algunas de las cuales son enterradas intactas para su posterior consumo. Los agoutis entierran tres a siete semillas por cada semilla comida. La mayoría de frutos caen a 12 m aproximadamente de la base del árbol. Esto puede agregarse a los 10-15 m de distancia que las semillas son enterradas. Las semillas pueden ser extendidas en una segunda dispersión cuando las semillas son desenterradas por predadores de semillas y enterradas aun más lejos. Se ha observado en algunos casos que las semillas son dispersas hasta 100 m, de esta manera se propaga *B. excelsa*. El éxito germinativo parece depender de las condiciones de humedad del lugar donde fueron enterradas, estas semillas pueden permanecer viables por varios años. En raras ocasiones las semillas pueden ser encontradas germinando dentro del fruto intacto en el suelo. (Zuidema y Boot, 2002; Mori, 1995)

B. excelsa tiene flores zigomorfas, los estambres al estar fusionados en su base se prolongan hacia un lado formando un andróforo o capuchón que selecciona la entrada del polinizador, ya que solo abejas robustas son capaces de sacar el néctar. Los polinizadores de *B. excelsa* son abejas de los géneros *Bombus*, *Centris*, *Epicharis*, *Eulaema*, y *Xylocopa* (Abejas euglosinas). Estas abejas entran a las flores para extraer néctar de la lígula; al mismo tiempo, las abejas se

impregnan del polen sobre la cabeza y la espalda, el cual es depositado sobre los estigmas de flores visitadas subsecuentemente. Para efectuar la fertilización, se necesita la transferencia de polen de un árbol a otro ya que esta especie tiene poca autocompatibilidad (Motta, 2002; Mori, 1995) Estas abejas son capaces de localizar comida y fragancias y usar recursos lejos de su lugar de reproducción debido a su excepcional capacidad de vuelo. Estas características aseguran la polinización cruzada de muchas especies. Las euglosinas más grandes pueden volar distancias considerables de hasta 23 km., desde el suelo sobre lagos y colinas empinadas sugiriendo que los paisajes montañosos no obstruyen el movimiento de las abejas. (Tonhasca *et al.*, 2002; Dressler, 1982; Janzen, 1971).

La cosecha de la nuez del Brasil se obtiene casi exclusivamente de rodales naturales en el bosque, lo cual explica el creciente interés en *B.excelsa* como especie clave para la conservación y el desarrollo. (Mori, 1992)

1.5.5 Utilización

Las semillas proveen alimentación de buena calidad. Su alto contenido de ácido linoléico puede contribuir al equilibrio de ácido lipídico esencial. Tiene alto contenido protéico y oleoso, contiene aproximadamente 14% de proteína, 67% de grasa digerible y 11% de carbohidratos además de calcio, fósforo, potasio, vitamina B y la rara vitamina excelsina. El aceite es rico en ácidos grasos no saturados y tiene sabor suave y agradable, pudiendo ser usado en ensaladas y sofreídos. (Chunhieng *et al.*, 2004; Wickens, 1995; Elías y Bressani, 1960). Sin embargo, el mayor beneficio de la castaña es que es especialmente rica en selenio, conocido por sus capacidades antioxidantes y antirradicalarias. El consumo de 2 castañas diarias incrementa el estado de selenio y ayuda al funcionamiento del

sistema inmunológico. (Thomson *et al.*, 2008) Las semillas se pueden usar para cocinar y para hacer jabones y la cápsula de la semilla se utiliza para elaborar artesanías (Wickens, 1995). La madera es excelente, pero los árboles que aún quedan son considerados más valiosos vivos como una fuente de nueces.

CAPITULO 2

MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 Área de trabajo

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

2.2 Lugares de muestreo

La colecta se realizó en el departamento de Madre de Dios en siete localidades: Muymanu, Manuripe, Piedras, Pariamarca, Pariamanu, Pampa Hermosa y Valencia (Figura 4) (Tabla 1).

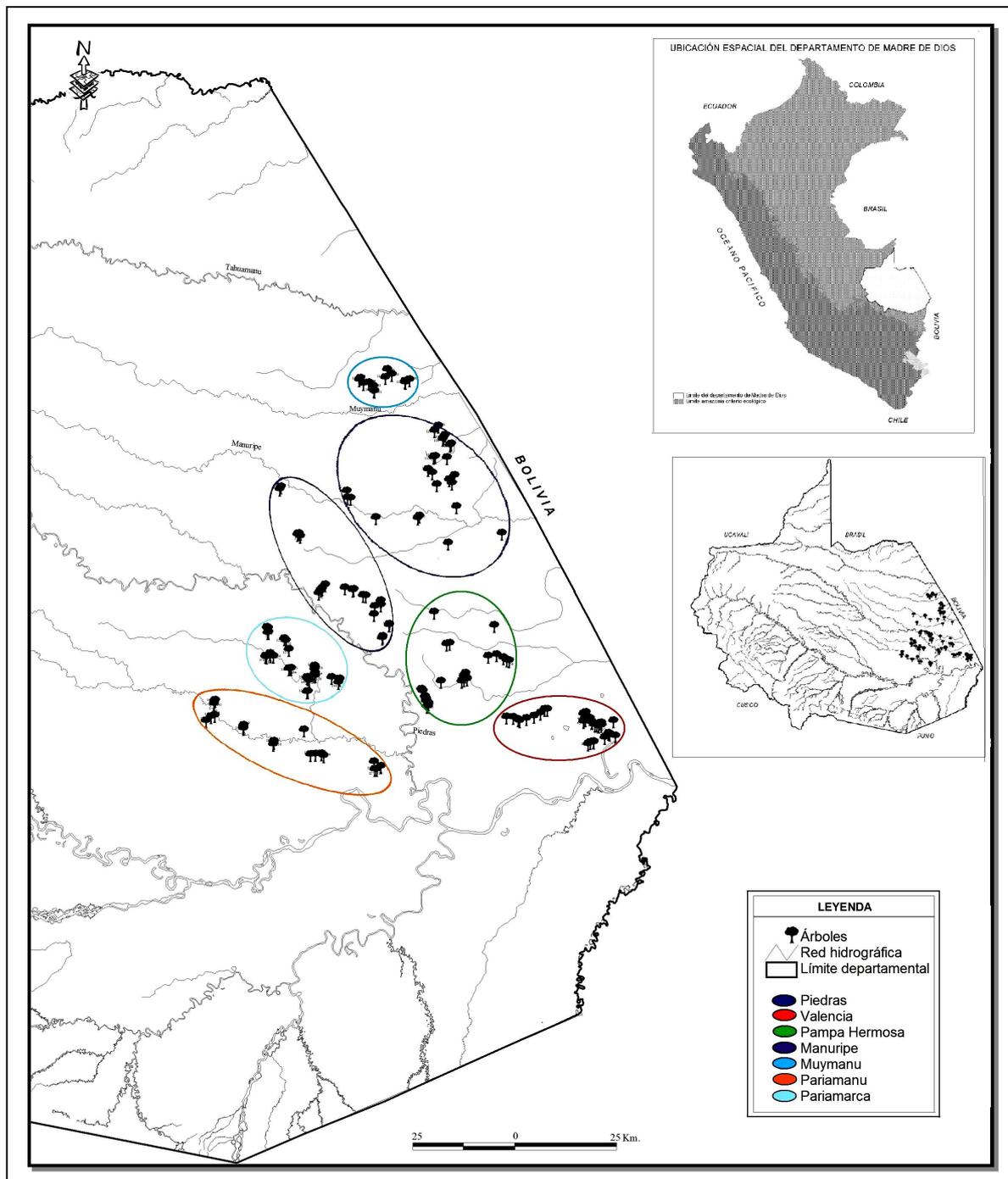


Figura 4.- Mapa de ubicación de las siete localidades de *Bertholletia excelsa* "castaña" del departamento Madre de Dios.

Tabla 1. Localidades, número de individuos y ubicación geográfica (grados) latitud y longitud de siete localidades de *Bertholletia excelsa* “castaña” en el departamento de Madre de Dios.

Localidades	Número de individuos	Ubicación geográfica (grados)	
		Latitud	Longitud
Piedras	22	75° 24' 8''	12° 8' 30''
Valencia	32	74° 52' 43''	12° 27' 8''
Pampa Hermosa	23	75° 8' 52''	12° 20' 33''
Manuripe	26	75° 13' 6''	11° 54' 13''
Muymanu	12	75° 18' 49''	11° 41' 31''
Pariamanu	21	75° 31' 33''	12° 29' 12''
Pariamarca	28	75° 30' 24''	12° 19' 0''

2.3 Colecta y conservación del material biológico

Se colectaron muestras biológicas de 164 individuos (árboles) de *Bertholletia excelsa* “castaña”. De cada árbol se colectaron tres hojas y se cortó aproximadamente un tercio de la parte apical de cada hoja. Este material foliar fue conservado hasta su uso en el laboratorio dentro de tubos tipo falcón de 50 ml conteniendo piedras secantes (drierite: sulfato de calcio anhidro). El material biológico fue aislado de las piedras secantes en sobres de 15 x 15 cm de papel de aluminio. Los tubos fueron rotulados con el número de muestra, lugar de colecta, fecha y nombre del colector. (Palacios *et al.*, 2004).

2.4 Extracción de ADN usando el método CTAB (Bromuro de Cetil Trimetil Amonio)

La extracción de ADN se realizó a partir de tejido foliar mediante el protocolo modificado de extracción CTAB (Doyle & Doyle, 1987) descrito a continuación:

100mg de muestra fue triturada y mezclada en 1ml del buffer CTAB (CTAB 2%, NaCl 1M, EDTA 0.1M pH 8, Tris Base 0.2M), y 10µl de Proteinasa K (0.1mg/ml) en un tubo de 2 ml; el triturado fue macerado en baño María (60 °C x 24 horas). La separación del material genómico del resto de tejidos no digeridos fue realizado adicionando 1ml de cloroformo al tubo de 2 ml ya mencionado y centrifugando a 8 000rpm x 5 minutos. Quedó un sobrenadante el cual fue recolectado y separado en un tubo de 1.5 ml. El ADN del sobrenadante fue precipitado con isopropanol frío por 2 horas a -20 °C, seguida de una centrifugación a 13 000rpm x 15 minutos. Se obtuvo un pellet de ADN total que fue lavado dos veces con etanol al 70% a 13 000 rpm x 15 minutos. El pellet debió ser secado por aproximadamente 5 horas y finalmente resuspendido en 30 µl de agua ultrapura.

2.5 Determinación de la calidad y concentración del ADN extraído

La calidad y concentración del ADN extraído fue evaluado mediante el método espectrofotométrico de Maniatis (1989), utilizando un espectrofotómetro UV/Vis; la absorbancia se midió utilizando las longitudes de onda de 260 y 280nm. La calidad del ADN extraído fue evaluada en un rango de aceptación entre: 1.7 – 2.2 (A_{260}/A_{280}) y la concentración del ADN extraído se determinó con la fórmula: $[A_{260} \times \text{FD} \times 50\mu\text{g}/\mu\text{l}]$ en este caso el FD (Factor de Dilución) fue igual a 100.

2.6. Verificación del ADN extraído

La verificación del ADN extraído se realizó mediante la observación de bandas de ADN (electroforesis) en geles de agarosa al 0.8%, teñidos con bromuro de etidio (10mg/ml). La migración del ADN se realizó en una cámara electroforética horizontal a 100 voltios durante 30 minutos, la visualización de los geles y el registro de los mismos fue realizado en un fotodocumentador de luz UV (Ver Anexo 1).

2.7 Amplificación de ADN vía PCR utilizando marcadores microsatélites

La técnica SSR-PCR fue realizada en una mezcla que contenía 1µl de ADN molde (tomado del ADN extraído), 5 U/µl de Taq polimerasa, 5X de Buffer, 25mM de MgCl₂, 10mM de dNTPs, 10µM de primer (SSR) y se completó a 10µl con agua ultrapura (Ver Anexo 2A). Las condiciones de temperatura fueron: una desnaturalización inicial a 96°C x 2min., seguida de 35 ciclos consistentes en: desnaturalización (94°C x 1 min.), hibridación (56.8°C x 1 min.), elongación (72°C x 1 min.). Seguida de una extensión final a 72°C x 10 min. (Ver Anexo 2B). Los primers utilizados son indicados en la tabla 2.

Tabla 2. Nombre, color, motivo de repetición, secuencia y tamaño en pb (pares de bases) de primers de microsatélites desarrollados por Reis y colaboradores en el 2008 para *Bertholletia excelsa* “castaña”.

Locus	Motivo de repetición	Color	Secuencia de primers	Rango del tamaño de alelos
Bex03	(AG) ₁₃	6FAM (Azul)	F: CTACCTACAGGTCCGTGCCA R: CGTATTTTCGTGTCAAACCTCT	92-106
Bex22	(CT) ₃₈	NED (Amarillo)	F: GCATTCTCTCATTTTCGCTTG R: CCCTAGCAATCGTCGTCTTC	118-136
Bex01	(AG) ₂₂	HEX (Verde)	F: TTCCAGGCATTTTGTACAG R: CAAGAGCGCAGGAGAAGATT	210-248
Bex09	(CT) ₃₂	6FAM (Azul)	F: TATTCCATGGTCCTCCGT R: AGTCAATCATCTTCAAGAGT	98 - 138
Bex30	(CT) ₂₃ (CA) ₁₅	NED (Amarillo)	F: TGGAACGGTCACTTGAGACA R: CCCTCTCTCCTTCGCTTTTT	130 - 170
Bex37	(CT) ₁₉	HEX (Verde)	F: TGCATGCTATGTTTCATTGCT R: CACGCAACCTCACAGTCTTG	176 - 204

F = Forward (hacia delante), R = Reverse (reverso)

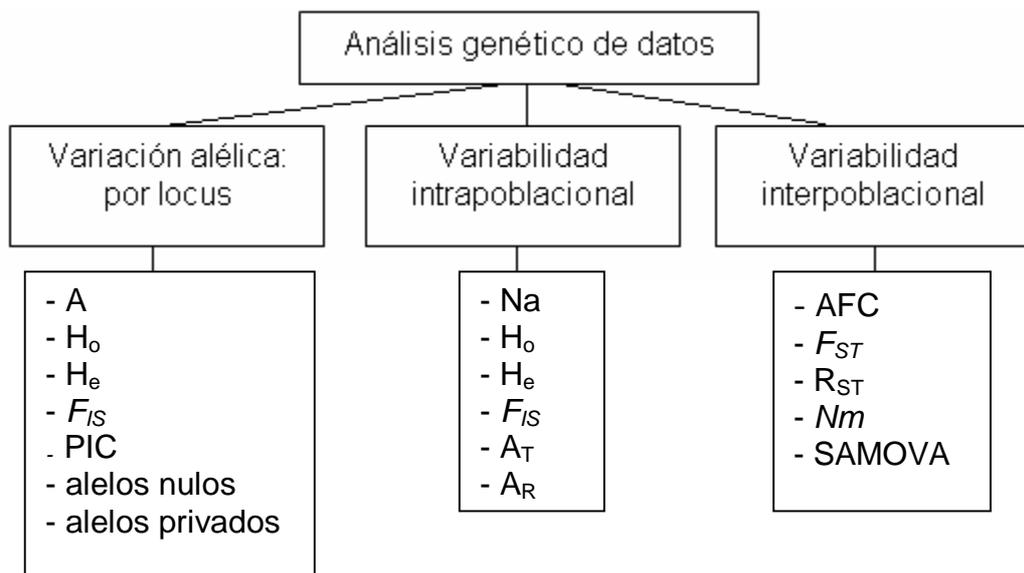
2.8 Visualización de los productos de amplificación

El éxito de la amplificación de los productos de PCR fue verificado preliminarmente por electroforesis en geles de agarosa 2% teñidos con bromuro de etidio (10mg/ml) y corridos en cámaras electroforéticas horizontales. La migración de los productos amplificados se realizó a 100 voltios durante 30 minutos y el registro del gel se realizó mediante un foto documentador con luz UV (Ver Anexo 2C).

2.9 Análisis y lectura de microsatélites

Los productos de amplificación fueron desnaturalizados y separados mediante electroforesis capilar utilizando un analizador genético (Applied Biosystems) 3130. Se tomó 1µl del producto de PCR, junto con 8.6µl de Formamida y 0.4µl de GeneScan 500 ROX (marcador de peso rojo). Los alelos de los microsatélites fueron visualizados, usando el software Peak Scanner versión 1.0 (<https://products.appliedbiosystems.com>) (Ver Anexo 3 y 4) y registrados en una planilla (Ver Anexo 5).

2.10 Análisis genético de datos



2.10.1 Variación alélica y variabilidad intrapoblacional

La diversidad genética se analizó, desde el punto de vista de la variedad alélica, mediante el cálculo del número medio y total de alelos por locus y por población, alelos privados (alelos encontrados en una sola población), y a nivel de la proporción de los diferentes genotipos dentro de las poblaciones, mediante la heterocigosidad esperada (H_e) y heterocigosidad observadas (H_o) por locus y heterocigosidad esperada (H_e) y heterocigosidad observada (H_o) medias por población.

La deficiencia o exceso de heterocigotos promedio en cada locus y en cada población se basa en la idea de que la subdivisión de una población lleva consigo un efecto similar a la endogamia; y por tanto, es posible medir este efecto en términos de la reducción en la proporción de genotipos heterocigóticos, es decir, en términos de H .

El coeficiente de endogamia (F_{IS}) mide la reducción en la heterocigosidad de un individuo debido a la existencia de cruzamientos no al azar dentro de su subpoblación. Para evitar confusiones llamaremos a este coeficiente de endogamia F_{IS} . Por tanto,

$$F_{IS} = \frac{H_S - H_I}{H_S} = \frac{H_e - H_o}{H_e}$$

Donde: $H_S = H_e$ = Heterocigosidad esperada
 $H_I = H_o$ = Heterocigosidad observada

Asímismo, se evaluaron las desviaciones del equilibrio de Hardy-Weinberg, comparando los valores de F_{IS} de los datos observados con valores en los que los alelos fueron permutados 1000 veces al azar entre los individuos. Se utilizaron los programas GenAlex versión 6 (Peakall and Smouse 2005) y Genetix versión 4.05.2 (Belkhir *et al.*, 2004).

2.10.1.1 Contenido de información polimórfica (PIC- Polymorphism Information Content)

Es usado para medir la informatividad de un marcador genético en estudios de vínculo. Como una medida de polimorfismo de un marcador, PIC depende solo del número de alelos y la frecuencia de cada alelo en un locus. Su valor varía de 0 (monomórfico) a 1 (altamente polimórfico con muchos alelos de frecuencias semejantes). (Tabla 3) (Guo y Elston, 1999). Siendo p_i la frecuencia del alelo i -ésimo. El valor promedio de PIC para el total de loci representa la diversidad genética total (H_t) (Barcaccia *et al.*, 2003).

$$PIC = 1 - \sum p_i^2 - \sum (2 \cdot p_i^2 \cdot p_j^2)$$

Tabla 3. Clasificación de Valores de PIC (Tomado de Botstein *et al.* 1980)

PIC > 0.5	Altamente informativo
0.5 > PIC > 0.25	Razonablemente informativo
PIC < 0.25	Ligeramente informativo

El PIC se obtuvo colocando la frecuencia absoluta de cada alelo en la siguiente página: <http://www.genomics.liv.ac.uk/animal/pic.html>

2.10.1.2 Frecuencia de alelos nulos

La frecuencia de alelos nulos es un indicador importante de la garantía de los resultados del análisis de microsatélites, sobre todo en estudios genéticos de una población. Dicha frecuencia es calculada mediante un algoritmo iterativo basado en las frecuencias esperadas y observadas de los genotipos analizados. La existencia de un “alelo

nulo” ocurre cuando un oligonucleótido como los usados y definidos en el presente trabajo no puede hibridar con el ADN, probablemente como consecuencia de la presencia de mutaciones puntuales, de forma que no sea detectable cuando la heterocigosidad esperada (H_e) es inferior o igual a la heterocigosidad observada (H_o), la frecuencia de alelos nulos es entonces negativa o cero (Tabla 4). En este caso, se puede concluir que el análisis realizado refleja realmente la variabilidad de la población. En caso contrario, la presencia de alelos nulos disminuye la heterocigosidad esperada y en consecuencia resulta en una sobreestimación del nivel de homocigosidad (Pemberton *et al.* 1995). La probabilidad de existencia de alelos nulos se estimó mediante el programa Cervus 2.0 (1998) de acuerdo a Brookfield (1996).

$$r = \frac{H_e - H_o}{1 + H_e}$$

Tabla 4. Clasificación de las frecuencias de alelos nulos (Tomado de Chapuis y Estoup, 2007)

$r < 0.05$	Insignificante
$0.05 < r < 0.20$	Moderada
$r > 0.20$	Alta

2.10.2 Variabilidad interpoblacional

2.10.2.1 Análisis Factorial de Correspondencia (AFC)

El Análisis Factorial de Correspondencia (AFC) es un tipo de análisis particularmente bien adaptado para describir las asociaciones entre variables cualitativas de un conjunto de individuos, analiza tablas de

contingencia cruzando las modalidades de las variables. Su objetivo principal es generar una representación gráfica de los individuos en un espacio de dos o tres dimensiones en función de sus proximidades (Gazel, 1999).

El Análisis Factorial de Correspondencia analiza una matriz con ambos alelos por cada locus informativo, para el tratamiento de datos en el Software Genetix versión 4.05.2 (Belkhir *et al.*, 2004). En este trabajo se realizó un análisis factorial de correspondencia para determinar las diferencias genéticas existentes entre siete grupos de la especie *Bertholletia excelsa*.

2.10.2.2 Índice de fijación (F_{ST})

El efecto de la subdivisión de la población se mide por un parámetro denominado "índice de fijación" (simbolizado por F_{ST}), que es la reducción promedio en la heterocigosidad de una subpoblación debido a la deriva genética por azar. El Índice de fijación (F_{ST}) indica el grado de diferenciación entre los grupos analizados, tomados de dos en dos, explicando los cambios en los perfiles debido a la subdivisión poblacional y deriva genética, para ello utilizamos el estimador de Weir & Cockerham (1984) y Weir (1990):

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

Donde:

A_i = Componente de la variación entre los grupos.

B_i = Componente de la variación dentro de cada grupo

Los valores del F_{ST} varían entre 0 y 1. Cuando $F_{ST} = 0$, los diferentes grupos se comportan como uno solo indicando que no existe divergencia genética entre ellos. Cuando el $F_{ST} = 1$, la estructuración es máxima lo que sugiere que los grupos están fijados (Tabla 5). Se

establece el siguiente criterio para clasificar el grado de diferenciación entre grupos:

Tabla 5. Clasificación de Valores de F_{ST} (Tomado de Hartl & Clark, 1997)

0.00 – 0.05	Diferenciación genética pequeña
0.05 – 0.15	Diferenciación genética moderada
0.15 – 0.25	Diferenciación genética alta
$F_{ST} > 0.25$	Diferenciación genética muy alta

Para la significancia (P) de la diferencia entre poblaciones multilocus, se compara el estimador del F_{ST} real con 1000 estimadores de F_{ST} obtenidos en situaciones donde no hay estructuración, rompiendo la hipotética estructuración real de manera artificial por permutaciones de los individuos en el conjunto de las poblaciones. Se considera que la diferencia es significativa cuando el F_{ST} es mayor a 95 % ($P < 0.05$) en relación a los F_{ST} de las 1000 permutaciones sin estructuración. Los índices de fijación fueron calculados con ayuda del Software Genetix versión 4.05.2 (Belkhir *et al.*, 2004).

2.10.2.3 Estimador de diferenciación específica de microsatélites (R_{ST})

Es un análogo al F_{ST} e independiente del índice de mutación. La mutación es poco importante cuando los niveles de flujo génico son altos. Debido a que los microsatélites parecen seguir el modelo SMM, Slatkin mostró:

$$R_{ST} = \frac{(S - S_w)}{S}$$

Donde S y S_w son los promedios al cuadrado de la diferencia de los tamaños de alelos entre los pares de alelos dentro de las poblaciones y entre los pares de poblaciones (Balloux y Lugon-Moulini, 2002;

Michalakis y Excoffier, 1996). El R_{ST} se estimó con ayuda del software $R_{ST}Calc$ versión 2.2 (Goodman, 1997). Este software calcula el Rho , que es un estimador no sesgado del R_{ST} de Slatkin.

2.10.2.4 Número de migrantes (Nm)

Se estima el factor Nm en conjunto como número efectivo de migrantes por generación:

$$Nm = \frac{[(1/ F_{ST}) - 1]}{4}$$

Valores de $Nm > 1$ indican un flujo genético suficiente para impedir una diferenciación sustancial por deriva genética. Si existe una gran cantidad de flujo génico entre poblaciones locales, entonces todas las poblaciones evolucionan juntas; pero si hay poco flujo génico cada población evoluciona en forma casi independiente. El número de migrantes se calculó con la ayuda del software Genetix versión 4.05.2 (Belkhir *et al.*, 2004) para el caso del F_{ST} y el software $R_{ST}Calc$ versión 2.2 (Goodman, 1997) para el R_{ST} .

2.10.2.5 Análisis Espacial de Varianza Molecular (SAMOVA)

El SAMOVA (Dupanloup *et al.*, 2002) utiliza el Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) (Excoffier *et al.*, 1992) e información geográfica, e involucra la definición de grupos de poblaciones sin la necesidad de una delimitación *a priori* maximizando la diferenciación entre localidades. La significancia de la varianza de componentes de ϕ_{CT} (entre grupos), ϕ_{SC} (entre poblaciones dentro de grupos) y ϕ_{ST} (dentro de poblaciones) fue probada por 1000 permutaciones para cada nivel jerárquico. Se realizaron dos ($k=2$), tres ($k=3$), cuatro ($k=4$) y cinco ($k=5$) grupos.

2.11 Correlación entre las distancias geográficas y genéticas

La distancia genética refleja la diferenciación a nivel de frecuencias génicas expresada en el número de sustituciones alélicas por locus que se han dado en la evolución separada de dos poblaciones, grupos o especies. Se dice que hay una sustitución alélica cuando un alelo es reemplazado por otro diferente, o cuando un grupo de alelos es reemplazado por un grupo diferente.

Las relaciones entre las distancias genéticas ($F_{ST} / 1 - F_{ST}$) (Rousset, 1997) y geográficas (Km) fueron determinadas a partir del coeficiente de correlación de PEARSON, calculado en el software Microsoft Excel 2007. Los grados de libertad son 19 (g.l. = $n - 2$) y el valor crítico de p al 95% es 0.433 obtenido de la tabla en el website. <http://www.gifted.uconn.edu/siegle/research/correlation/corrchrt.htm>

2.12 Relaciones interpopulacionales

Para elaborar el dendrograma, el cálculo se realizó con los programas Seqboot, Gendist, Neighbor y Consense del paquete de inferencia filogenética Phylip versión 3.69 (Felsenstein, 1993).

Las relaciones entre las especies y/o grupos en estudio del género *Bertholletia* fueron estimados elaborando un dendrograma UPGMA (Unweighted Pair Group Method with the Arithmetic Averaging) usando el programa Gendist (Phylip versión 3.69) a partir de la distancia de Rousset. Cada grupo fue tratado como una unidad taxonómica operacional y el soporte estadístico fue obtenido de 1000 muestras de bootstrap. Los valores en los dendrogramas indican el porcentaje de ocurrencia que los demás cluster (grupos) unidos entre sí presentan en la estructuración mostrada. La visualización de los dendrogramas fue posible mediante el programa Treeview (Page, 1996).

CAPITULO 3 RESULTADOS

3.1 Variación alélica

En un total de 164 individuos de *Bertholletia excelsa* “castaña” analizados, se identificaron 47 alelos en seis marcadores microsatélites evaluados (Figura 7). Con una media de 7.8 alelos por locus. La mayor diversidad alélica fue encontrada en el locus Bex37 (11 alelos), y la más baja en el locus Bex03 (4 alelos).

Los valores de heterocigosidad esperada (H_e) variaron de 0.542 en el locus Bex01 a 0.771 en el locus Bex09. En tanto que la heterocigosidad observada (H_o) varió de 0.518 en el locus Bex01 a 0.744 en el locus Bex37. La media de la H_e y H_o fueron 0.688 y 0.680, respectivamente. Coeficientes de endogamia (F_{IS}) negativos fueron observados en los loci Bex22, Bex30 y Bex37 indicando un exceso de heterocigotos para estos loci. La media del contenido de información polimórfica (PIC) fue de 0.650; el mayor índice fue de 0.731 en Bex09 y el menor 0.518 en Bex01 (Tabla 6).

Tabla 6. Parámetros generales de la diversidad genética obtenidos para cada uno de los seis loci microsatélites analizados en los ejemplares de *Bertholletia excelsa* “castaña” del departamento de Madre de Dios.

LOCUS	A	H _o	H _e	F _{IS}	PIC
Bex03	4	0.701	0.717	0.023 ns	0.664
Bex22	9	0.713	0.703	-0.015 ns	0.667
Bex01	7	0.518	0.542	0.045 ns	0.518
Bex09	6	0.713	0.771	0.075 ns	0.731
Bex30	10	0.689	0.680	-0.013 ns	0.650
Bex37	11	0.744	0.715	-0.041 ns	0.672
Media	7.83	0.680	0.688	0.012 ns	0.650

Abreviaturas: Número de alelos (A), heterocigosidad esperada (H_e) y observada (H_o), coeficiente de endogamia (F_{IS}), contenido de información polimórfica (PIC). Los valores medios para cada uno de los índices también son presentados. ns = no significativo.

En la distribución de las frecuencias alélicas, de los 47 alelos encontrados, 22 presentaron frecuencias menores a 0.05, 23 estuvieron entre 0.05 y 0.5; y 2 fueron mayores a 0.5. El alelo 218 (Bex01) fue el que presentó mayor frecuencia (0.6585); en tanto que los alelos 151 y 163 (Bex22), 176 (Bex30), 204 y 218 (Bex37) presentaron la menor frecuencia (0.0030). Los pesos de los alelos variaron de 88 a 218 pb. La menor diferencia entre el peso más alto y el más bajo fue de 14 pb en el locus Bex03 y la diferencia más grande fue de 46 pb en el locus Bex30. El locus Bex03 presentó una mayor uniformidad en las frecuencias de sus alelos, en tanto que en el locus Bex01 se observó la predominancia de un alelo (218) sobre los otros (Figura 7).

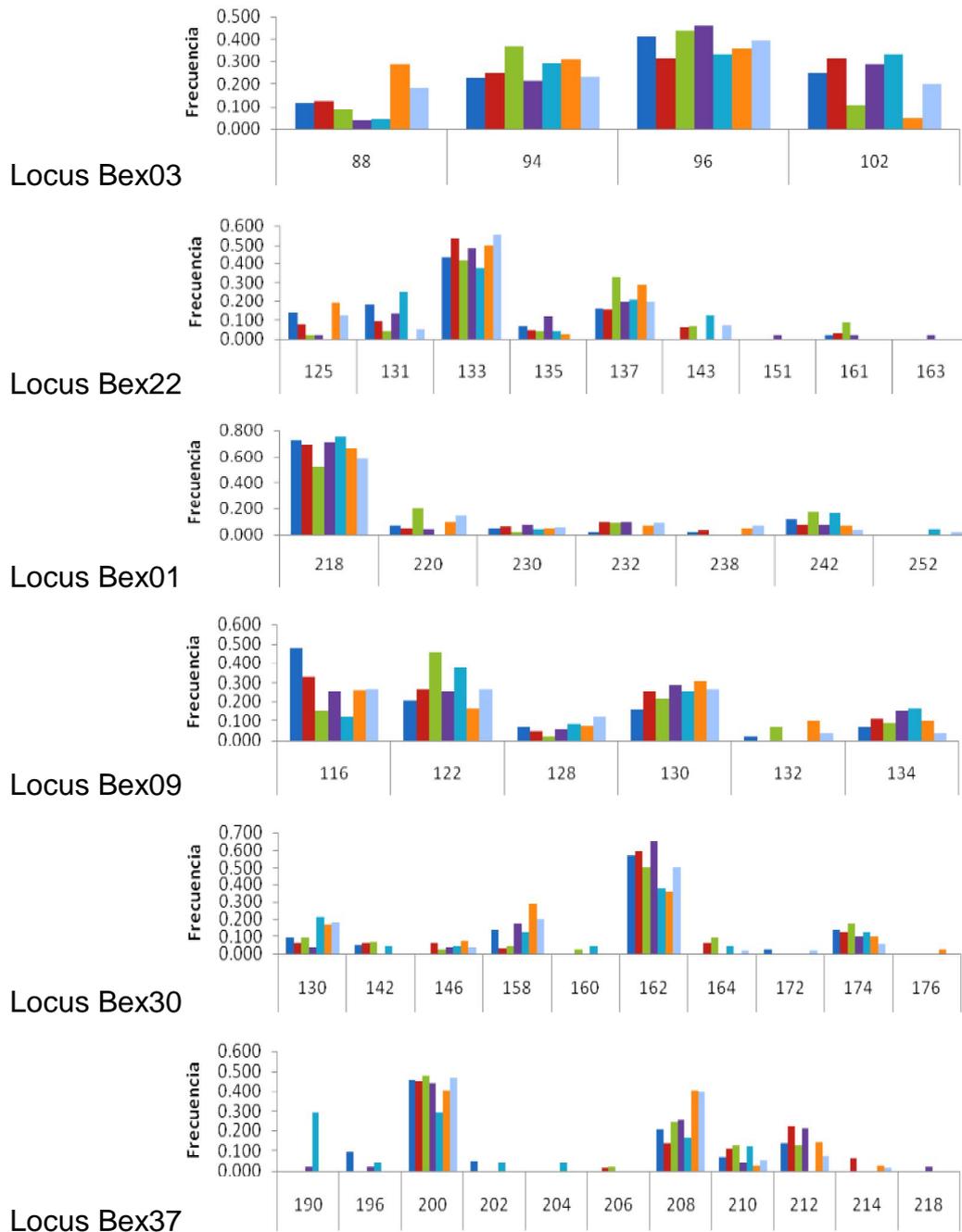


Figura 7.- Frecuencias de alelos en seis loci microsatélites obtenidos para 164 individuos de *Bertholletia excelsa* “castaña” provenientes de siete localidades del departamento de Madre de Dios. ■ Piedras; ■ Valencia; ■ Pampa Hermosa; ■ Manuripe; ■ Muymanu; ■ Pariamanu; ■ Pariamarca.

La frecuencia de alelos nulos para los seis loci microsatélites analizados variaron de -0.0273 (Bex37) a 0.0072 (Bex03). Estas frecuencias son consideradas insignificantes según la clasificación Chapuis y Estoup 2007 (Tabla 7).

Tabla 7. Frecuencia de alelos nulos encontrados en seis loci microsatélites de *Bertholletia excelsa* “castaña” proveniente de siete localidades del departamento de Madre de Dios.

Locus	Frecuencia alelos nulos
Bex03	0.0072 (insignificante)
Bex22	-0.0098 (insignificante)
Bex01	0.0115 (insignificante)
Bex09	0.0388 (insignificante)
Bex30	-0.0156 (insignificante)
Bex37	-0.0273 (insignificante)

Se identificaron cinco alelos privados, (alelos únicos para una localidad), en tres de las siete localidades, uno en Muymanu, uno en Pariamanu, y tres en Manuripe (Tabla 8).

Tabla 8. Alelos privados (en pb) y sus respectivas frecuencias (valores entre paréntesis) observados en seis loci microsatélites de *Bertholletia excelsa* “castaña” proveniente de siete localidades del departamento de Madre de Dios.

LOCALIDADES	LOCUS			TOTAL
	Bex22	Bex30	Bex37	
Manuripe	151 (0.019)			3
	163 (0.019)			
			218 (0.019)	
Muymanu			204 (0.042)	1
Pariamanu		176 (0.024)		1
TOTAL	2	1	2	5

3.2 Variabilidad genética dentro de cada localidad

Valencia y Pampa Hermosa fueron las localidades que presentaron el mayor número total de alelos ($A_T=35$), y por consiguiente la mayor riqueza alélica ($A_R=5.83$), entre las siete localidades analizadas (Tabla 9). Mientras que Pariamanu presentó los índices más bajos ($A_T=31$ y $A_R=5.17$). Todas las localidades presentaron bajos coeficientes de endogamia (F_{IS}), los cuales no fueron significativos y variaron entre -0.079 (Manuripe) y 0.061 (Pariamarca). Tanto la heterocigosidad observada como esperada presentaron poca diferencia entre las localidades.

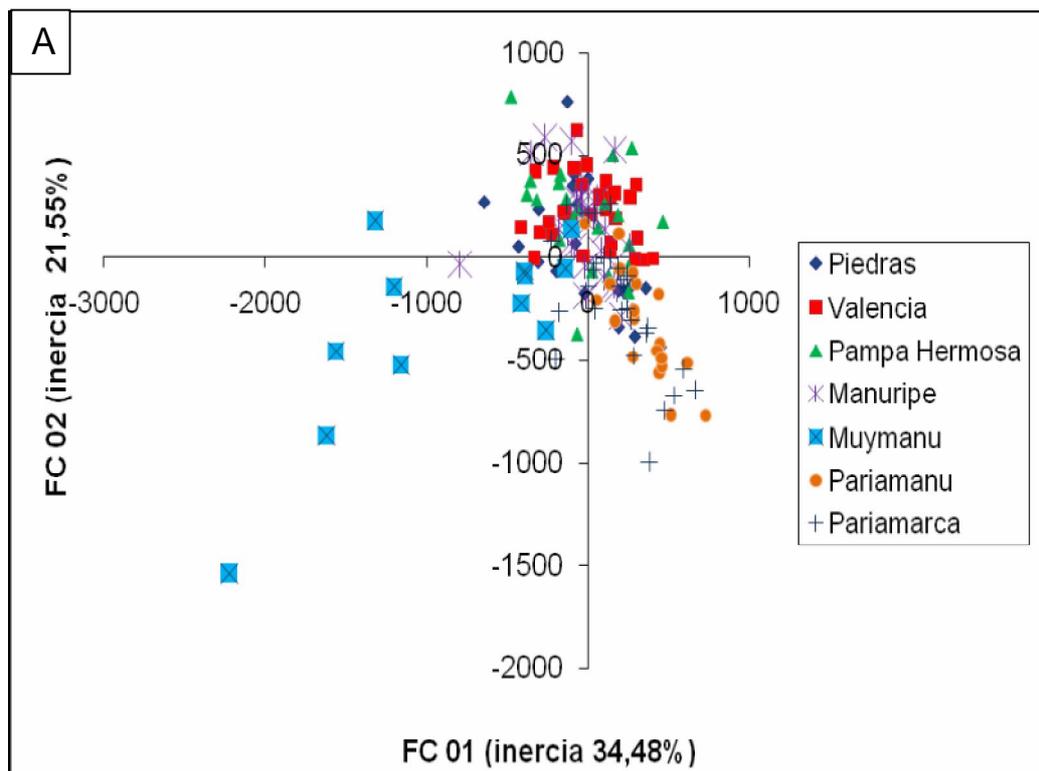
Tabla 9. Índices genéticos obtenidos a partir de seis loci microsatélites de *Bertholletia excelsa* “castaña” proveniente de siete localidades del departamento de Madre de Dios (Elaborada en base a los datos del Anexo 8).

Localidades	n	A_T	A_R	Media		F_{IS}
				H_o	H_e	
Piedras	22	34	5.67	0.652	0.655	0.029 ns
Valencia	32	35	5.83	0.703	0.662	-0.046 ns
Pampa Hermosa	23	35	5.83	0.696	0.683	0.004 ns
Manuripe	26	34	5.67	0.699	0.636	-0.079 ns
Muymanu	12	33	5.50	0.694	0.690	0.037 ns
Pariamanu	21	31	5.17	0.675	0.673	0.022 ns
Pariamarca	28	34	5.67	0.643	0.672	0.061 ns

Abreviaturas: Número de individuos (n), número total de alelos (A_T), media de número de alelos o riqueza alélica (A_R), media de heterocigosidad observada (H_o) y esperada (H_e) y coeficiente de endogamia (F_{IS}). ns = no significativo.

3.3 Variabilidad genética entre localidades

Los resultados del análisis factorial de correspondencia (AFC) muestra que los grupos no están claramente diferenciados a nivel genético presentando una fuerte sobreposición entre ellos (Figura 8, A, B y C). Los valores de inercia para los ejes 1, 2 y 3 explican el 34,48%, 21,55% y 18,78% de la variación respectivamente. Sin embargo, las figuras A y B muestran que la localidad de Muymanu presenta una diferenciación insipiente con relación a las demás localidades. Asimismo, la figura C, muestra que los individuos de la localidad Pampa Hermosa presentan esta misma tendencia cuando observados en estos ejes.



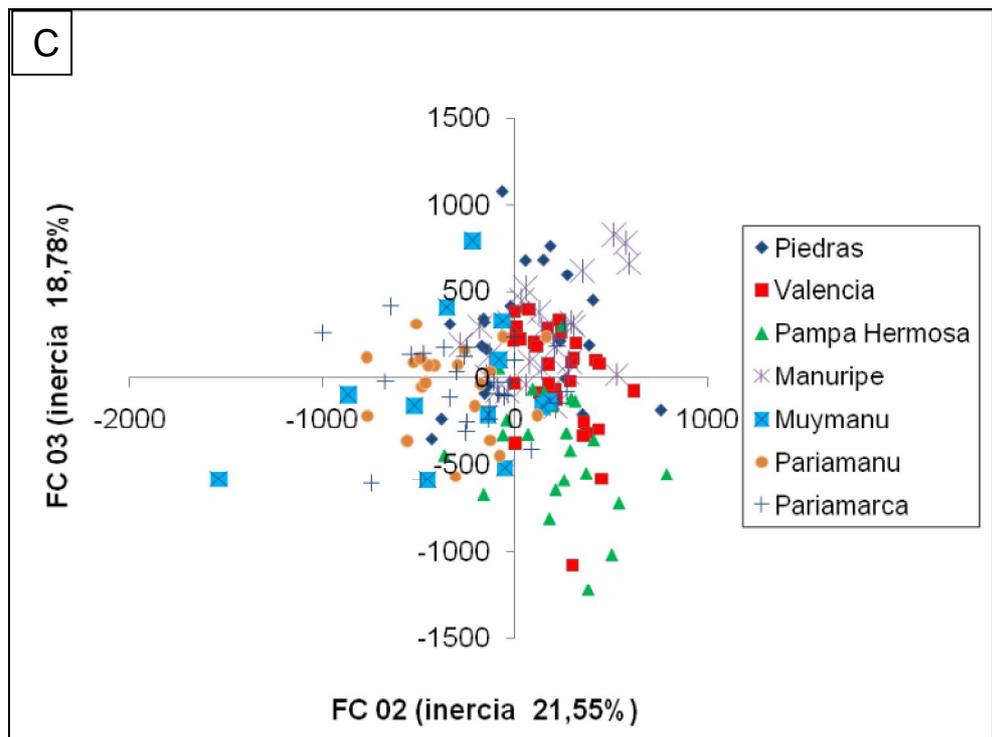
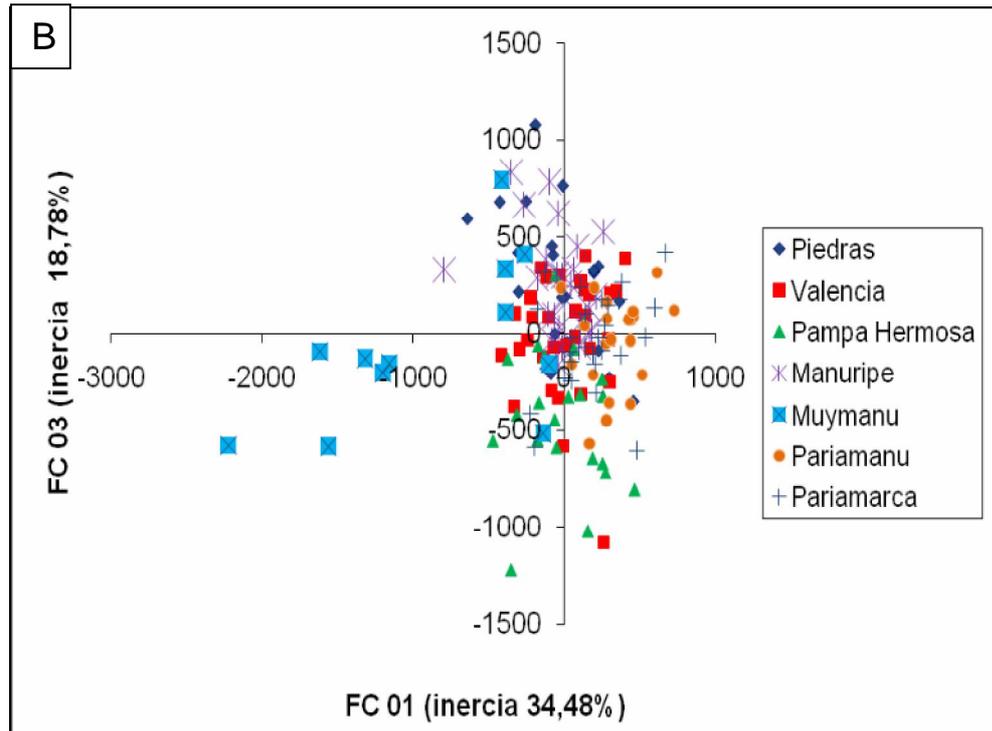


Figura 8. Proyección gráfica de los resultados del AFC para los ejes A) 1 y 2; B) 1 y 3; C) 2 y 3 encontrados en los individuos de *Bertholletia excelsa* “castaña” proveniente de siete localidades del departamento de Madre de Dios.

Las localidades con mayor diferenciación genética según los valores del índice de fijación ($F_{ST} = 0.038$, $***p < 0.001$) y el estimador de diferenciación específica de microsatélites ($R_{ST} = 0.112$, $**p < 0.01$) fueron Muymanu y Pariamanu. Mientras que las localidades más relacionadas para ambos índices fueron Valencia y Manuripe ($F_{ST}=0.000$; $R_{ST} = 0.000$), aunque estos valores no fueron significativos. Además el índice de fijación (F_{ST}) señaló que los pares de localidades Piedras-Valencia, Piedras-Manuripe, Pariamanu-Pariamarca no presentan diferenciación genética entre ellos (0.000) (Tabla 10).

Tabla 10. Índices de F_{ST} (arriba de la diagonal) y R_{ST} (debajo de la diagonal) calculados a partir de seis loci microsatélites de *Bertholletia excelsa* “castaña” proveniente de siete localidades del departamento de Madre de Dios.

	Pi	Vale	Pampa	Manu	Muy	Panu	Paca
Pi	-	0.000ns	0.025**	0.000ns	0.020*	0.020*	0.007ns
Vale	0.005 ns	-	0.018*	0.000ns	0.021*	0.029***	0.011*
Pampa	0.046 *	0.012ns	-	0.020**	0.021*	0.025**	0.014*
Manu	0.021 ns	0.000ns	0.012ns	-	0.021*	0.027**	0.009ns
Muy	0.056 *	0.076**	0.069 **	0.058**	-	0.038***	0.025*
Panu	0.059 **	0.046**	0.056**	0.075***	0.112**	-	0.000ns
Paca	0.008 ns	0.003ns	0.026*	0.022*	0.055*	0.006ns	-

Abreviaturas: Pi = Piedras, Vale = Valencia, Pampa = Pampa Hermosa, Manu = Manuripe, Muy = Muymanu, Panu = Pariamanu, Paca = Pariamarca. $*** p < 0.001$; $**p < 0.01$; $*p < 0.05$; ns = no significativo.

Los índices globales de F_{ST} variaron de 0.016 en Bex03 a 0.047 en Bex37, con una media de 0.024. Mientras que los valores de R_{ST} variaron de 0.001 en Bex01 a 0.116 en Bex37, con una media de 0.045 (Tabla 11).

Tabla 11. Promedios del índice de fijación (F_{ST}) y el estimador de diferenciación específica de microsatélites (R_{ST}) para cada uno de los seis loci microsatélites de *Bertholletia excelsa* “castaña” proveniente de siete localidades del departamento de Madre de Dios.

LOCUS	F_{ST}	R_{ST}
Bex03	0.016	0.066
Bex22	0.021	0.057
Bex01	0.022	0.001
Bex09	0.018	0.007
Bex30	0.019	0.024
Bex37	0.047	0.116
Media	0.024	0.045

El flujo genético, determinado por el número de migrantes (Nm) por generación, calculado en base a los valores de F_{ST} varió de 6.26 (Muymanu-Pariamanu) al infinito (Piedras-Valencia, Piedras-Manuripe, Lago Valencia-Manuripe y Pariamanu-Pariamarca). El Nm basado en el R_{ST} varió de 1.97 (Muymanu-Pariamanu) al infinito (Valencia-Manuripe) indicando un elevado intercambio de genes entre las localidades (Tabla 12).

Tabla 12. Número de migrantes (Nm) por generación obtenidos de seis loci de *Bertholletia excelsa* “castaña” proveniente de siete localidades del departamento de Madre de Dios. Arriba de la diagonal, basado en el F_{ST} y debajo de la diagonal, basado en el R_{ST} .

	Pi	Vale	Pampa	Manu	Muy	Panu	Paca
Pi	-	∞	9.77	∞	11.98	12.14	35.99
Vale	47.24	-	13.95	∞	11.68	8.23	23.31
Pampa	5.13	20.31	-	12.05	11.80	9.58	18.43
Manu	11.64	∞	20.94	-	11.86	9.13	28.22
Muy	4.23	3.06	3.39	4.04	-	6.26	9.65
Panu	3.96	5.16	4.23	3.08	1.97	-	∞
Paca	32.30	86.93	9.46	10.90	4.31	38.34	-

Abreviaturas: Pi = Piedras, Vale = Valencia, Pampa = Pampa Hermosa, Manu= Manuripe, Muy = Muymanu, Panu = Pariamanu, Paca = Pariamarca. Infinito (∞).

El Análisis Espacial de Varianza Molecular (SAMOVA) mostró que las localidades presentan poca diferenciación genética entre ellas, con bajos porcentajes de diferenciación entre las agrupaciones obtenidas. Variando de 1.33% en $k=2$ a 2.24% en $k=4$ (Tabla 13).

Tabla 13. Análisis espacial de varianza molecular (SAMOVA) de seis loci microsatélites de *Bertholletia excelsa* “castaña” proveniente de siete localidades del departamento de Madre de Dios.

Fuente de variación	g.l.	Varianza de componentes	Porcentaje de variación	Valor de P
$k = 2$ grupos (Piedras, Valencia, Pampa Hermosa, Manuripe, Pariamanu, Pariamarca) y (Muymanu)				
ϕ_{CT}	1	0.028	1.33	0.141 \pm 0.011
ϕ_{SC}	5	0.025	1.19	0.000 \pm 0.000
ϕ_{ST}	321	2.039	97.48	0.000 \pm 0.000
$k = 3$ grupos (Piedras, Valencia, Manuripe, Muymanu), (Pariamanu, Pariamarca) y (Pampa Hermosa)				
ϕ_{CT}	2	0.036	1.73	0.013 \pm 0.004
ϕ_{SC}	4	0.005	0.24	0.000 \pm 0.000
ϕ_{ST}	321	2.039	98.03	0.000 \pm 0.000
$k = 4$ grupos (Piedras, Valencia, Manuripe), (Pariamanu, Pariamarca), (Pampa Hermosa) y (Muymanu)				
ϕ_{CT}	3	0.047	2.24	0.005 \pm 0.002
ϕ_{SC}	3	-0.006	-0.29	0.000 \pm 0.000
ϕ_{ST}	321	2.039	98.06	0.000 \pm 0.000
$k = 5$ grupos (Piedras, Valencia, Manuripe), (Pariamanu), (Pariamarca), (Pampa Hermosa) y (Muymanu)				
ϕ_{CT}	4	0.043	2.06	0.024 \pm 0.005
ϕ_{SC}	2	-0.005	-0.26	0.000 \pm 0.000
ϕ_{ST}	321	2.039	98.2	0.000 \pm 0.000

Significado: ϕ_{CT} (entre grupos); ϕ_{SC} (entre poblaciones dentro de grupos); ϕ_{ST} (dentro de poblaciones).

3.4 Distancia genética entre poblaciones

Los valores de la distancia genética de Rousset variaron de 0.0399 entre Muymanu y Pariamanu y 0.000 entre los pares Piedras-Valencia, Piedras-Manuripe, Valencia-Manuripe, Pariamanu-Pariamarca. Siendo las localidades más distantes geográficamente Muymanu y Valencia (96.00 km.) y las más cercanas Pariamanu y Pariamarca (18.76 km.) (Tabla 14).

Tabla 14. Valores de distancia genética de Rousset (arriba de la diagonal) y distancias geográficas en kilómetros (debajo de la diagonal) de seis loci microsatélites de *Bertholletia excelsa* “castaña” proveniente de siete localidades del departamento de Madre de Dios.

	Pi	Vale	Pampa	Manu	Muy	Panu	Paca
Pi	-	0.0000	0.0256	0.0000	0.0209	0.0206	0.0070
Vale	66.27	-	0.0179	0.0000	0.0214	0.0304	0.0107
Pampa	35.39	31.61	-	0.0208	0.0212	0.0261	0.0136
Manu	32.89	70.72	48.78	-	0.0211	0.0274	0.0089
Muy	50.27	96.00	73.65	25.38	-	0.0399	0.0259
Panu	40.20	70.36	44.09	72.17	90.26	-	0.0000
Paca	22.33	69.89	39.17	55.15	71.76	18.76	-

Abreviaturas: Pi = Piedras, Vale = Valencia, Pampa = Pampa Hermosa, Manu= Manuripe, Muy = Muymanu, Panu = Pariamanu, Paca = Pariamarca.

3.5 Correlación entre las distancias genéticas y geográficas

Los valores de distancia genética ($F_{ST} / 1-F_{ST}$) no mostraron correlación ($r = 0.3821$; no significativo) con los valores de distancia geográfica (Km) entre las siete localidades de *Bertholletia excelsa* “castaña” estudiadas (Figura 9).

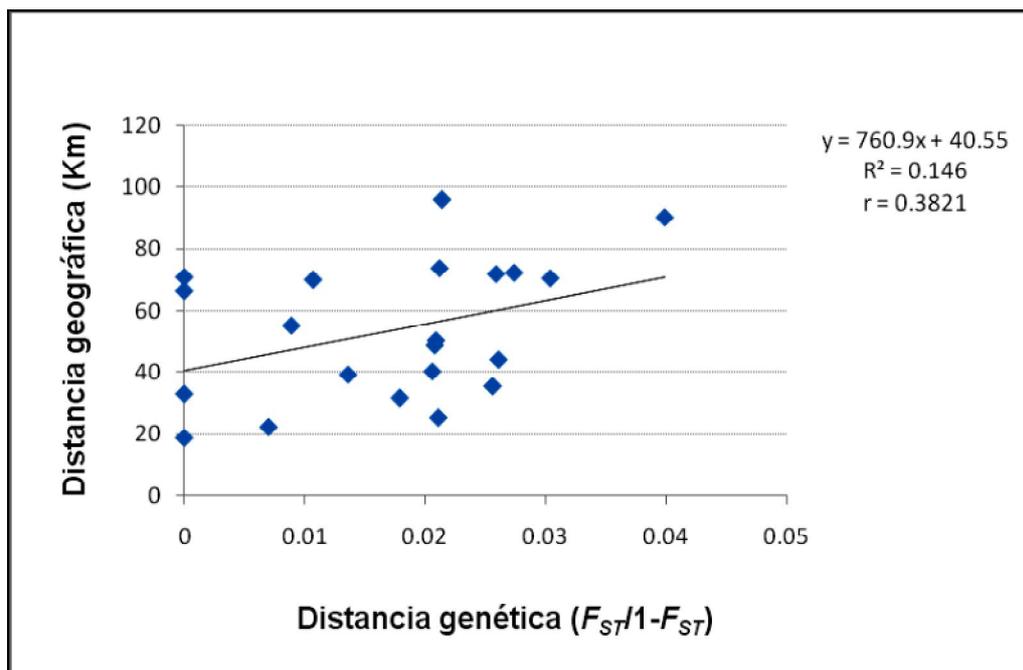


Figura 9. Representación gráfica del análisis de correlación entre la distancia geográfica (Km) y la distancia genética ($F_{ST}/1-F_{ST}$) de *Bertholletia excelsa* “castaña” proveniente de siete localidades del departamento de Madre de Dios.

3.6 Relaciones interpoblacionales

El dendrograma (Figura 10) basado en la distancia de Rousset (1997) mostró la conformación de cuatro grupos principales. Dos agrupaciones mixtas cercanamente relacionadas (bootstrap 68): la primera conformada por Piedras, Manuripe y Valencia (grupo A) y la segunda por Pariamanu y Pariamarca (grupo B). Las dos agrupaciones restantes Pampa Hermosa (grupo C) y Muymanu (grupo D), no forman agrupaciones mixtas y están más relacionadas entre sí (bootstrap 100). De todas las agrupaciones obtenidas Muymanu fue la que presentó la mayor distancia con relación a las demás.

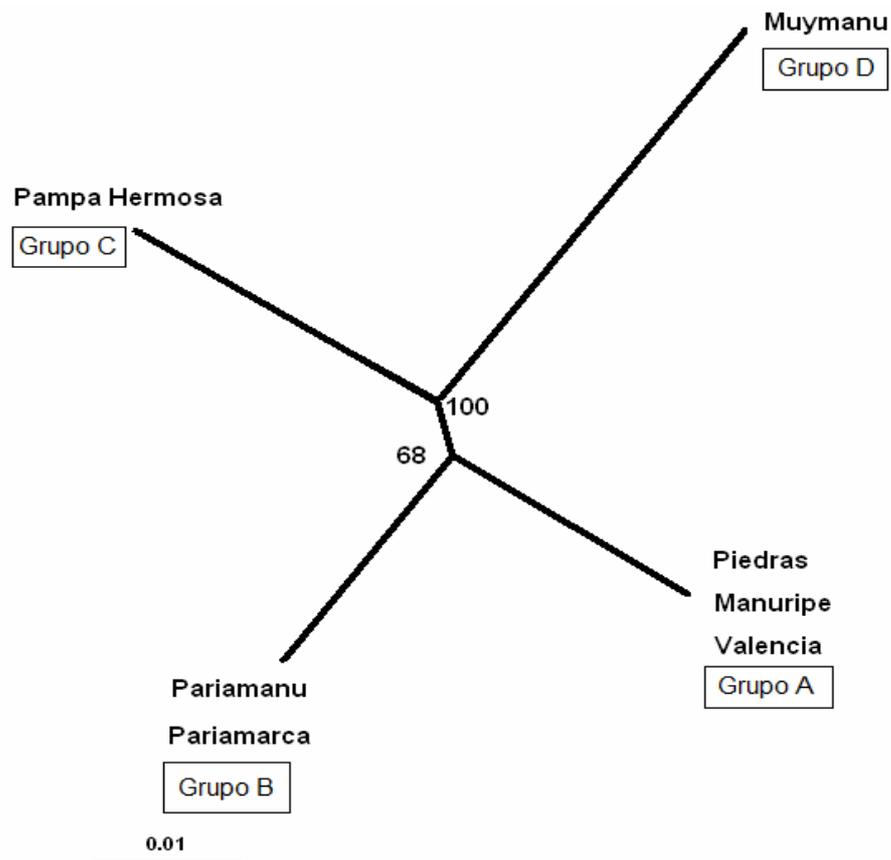


Figura 10. Dendrograma construido a partir de las Distancias de Rousset (1997) según el criterio de agrupamiento UPGMA. Los números en los nudos corresponden a los valores de bootstrap obtenidos con 1000 réplicas.

CAPITULO 4

DISCUSIÓN

Para que un programa de manejo sea sostenible para una especie, debe basarse en el análisis previo de su diversidad genética. La cual se basa en la evaluación de la magnitud y los patrones de diversidad genética, así como en la estimación del flujo de genes entre poblaciones, y la investigación de las relaciones entre flujo genético y demografía, que constituyen además un prerrequisito para los planes de conservación.

Teniendo en cuenta que los estudios de la variabilidad genética intrapoblacional e interpoblacional no solo permiten determinar el status biológico de las poblaciones, sino también proveen información esencial sobre el estado de su conservación actual (Barrett y Kohn, 1991), la presente investigación de la castaña *Bertholletia excelsa*, basado en marcadores microsatélites, constituye una poderosa herramienta de evaluación de sus poblaciones naturales en la Amazonía peruana, que servirá de base para la formulación de planes de mejoramiento genético y manejo sostenido.

Los loci microsatélites analizados mostraron altos niveles de polimorfismo ($A=7.8$), comparable con los niveles encontrados en otros árboles, tales como *Pithecellobium elegans*, *pithecellobium* ($A=7.8$; Chase *et al.*, 1996), *Pinus strobus*, pino blanco ($A=7.7$; Marquardt y Epperson, 2004), *Quercus petraea*, roble albar ($A=7$; Muir *et al.*, 2004), *Pinus resinosa*, pino rojo ($A=9$; Boys *et al.*, 2005), *Populus tremuloides*, álamo temblón ($A=8.3$; Cole, 2005), *Cocos nucifera*, coco ($A=7.35$; Rajesh *et al.*, 2008).

Asímismo, en el presente trabajo encontramos que el locus Bex09, que tiene el mayor número de repeticiones ($CT= 32$), presentó solamente 6 alelos, mientras que en el locus Bex37 ($CT= 19$) se encontró el mayor número de alelos (11). Esto corrobora lo reportado por la literatura que no siempre los microsatélites basados en mayor número de repeticiones muestran mayor polimorfismo. Estudios previos indican que este patrón podría ser común en árboles forestales (Boys *et al.*, 2005; Echt *et al.*, 1996).

La frecuencia de alelos nulos fue insignificante para los seis loci estudiados de la castaña, variando de 0.0072 en Bex03 a 0.388 Bex09 (tabla 07). Teniendo en cuenta que los alelos nulos son citados como causas de la deficiencia de heterocigotos (Jarne y Lagoda, 1996), las bajas frecuencias de alelos nulos encontrados en los loci de castaña estudiados estarían indicando altos niveles de heterocigosidad a nivel poblacional y especialmente individual en esta especie. Esta afirmación es corroborada por el promedio de la heterocigosidad observada (H_o) encontrado (0.680).

Estos resultados pueden estar íntimamente relacionados con la naturaleza alógama y la existencia de un sistema de autoincompatibilidad de la especie favoreciendo la conservación del alto porcentaje de heterocigotos (Motta, 2002). Altos niveles de variabilidad genética garantizan la sobrevivencia y adaptación de las especies; la pérdida de esta variabilidad reduce el potencial evolutivo y el suceso reproductivo de las mismas (Frankham *et al.*, 2008).

El número de alelos privados es una estimativa indirecta del flujo génico, y cuanto más bajo sea éste, más alelos de este tipo surgen, y son fijados por eventos de mutación en una población (Slatkin, 1985). Además, la presencia de estos alelos, parece caracterizar a especies antiguas y relictas; y su completa ausencia podría indicar que las poblaciones tienen un origen relativamente reciente (Fernández-Palacios, 2004). Las bajas frecuencias encontradas en los alelos privados de la castaña (frecuencias menores a 1% de la población total) caracterizan a estos alelos como alelos raros, indicando probablemente que las poblaciones estudiadas presentan altos niveles de flujo genético entre ellas.

Los índices genéticos obtenidos muestran que la castaña en la región de Madre de Dios presenta una amplia variabilidad genética, todas las localidades mostraron en promedio números de alelos bastante similares, con valores totales superiores a 30. Los valores de heterocigosidad observada (H_o) y heterocigosidad esperada (H_e) contribuyen esta afirmación, inclusive observándose que la heterocigosidad observada fue mayor a la esperada en cinco de las siete localidades analizadas. Finalmente, los valores no significativos encontrados en el coeficiente de endogamia (F_{IS}) terminan por corroborar la gran diversidad genética que presenta la castaña en la región de Madre de Dios.

Los resultados antes mencionados, se corroboran con los elevados valores de variación genética que fueron encontrados en poblaciones naturales de castaña de la Amazonía brasilera (68.7%) cuando fueron evaluados con el marcador molecular RAPD (Kanashiro *et al.*, 1997).

Los resultados de AFC (fig. 05 A, B, C), SAMOVA (98.06% de la variación se encuentra dentro de las localidades, y que solo 2.24% entre ellas) y distancia genética (distancia promedio = 0.017) mostraron que las siete localidades evaluadas presentan poca diferenciación genética entre ellas, es decir que no forman entidades genéticas fuertemente estructuradas. Estas

afirmaciones son corroboradas por los altos niveles de flujo genético encontrado entre las localidades.

Estos resultados y sobre todo los altos flujos genéticos pueden ser explicados; primero, por la topografía poco accidentada de la región de Madre de Dios, con pocas barreras geográficas de gran importancia, lo que la convierte en una zona idónea para la proliferación de esta especie que sólo crece en tierra firme (Kainer *et al.*, 1998; Mori, 1992). Segundo, la característica de las especies leñosas de larga vida, como la castaña *B. excelsa* (Camargo *et al.*, 1994) que encierran mayor variación dentro de las poblaciones que entre ellas, en comparación con otros tipos de plantas (Hamrick *et al.*, 1992). Tercero, los agentes polinizadores, que en esta especie alogámica son las abejas euglosinas, las cuales son robustos insectos capaces de volar grandes distancias (Tonhasca *et al.*, 2002; Dressler, 1982; Janzen, 1971). Cuarto, los dispersores compuestos principalmente por roedores como agoutis, que suelen enterrar los frutos colectados entre 25 m hasta 100 de distancia del árbol madre (Zuidema y Boot, 2002; Mori, 1995).

Sin embargo, no debemos desestimar que estos bajos valores de diferenciación puedan estar influenciados por la pequeña escala geográfica del área de estudio, al tamaño muestral y al número de loci microsatélites utilizados.

Si bien los resultados de AFC, SAMOVA, distancia genética y flujo de genes muestran poca diferenciación entre las poblaciones, los valores globales de F_{ST} (0.024) y R_{ST} (0.045) estimados para cada par de poblaciones, muestran una muy débil diferenciación genética entre ellas. El valor global de F_{ST} (0.024) encontrado entre las poblaciones de castaña analizadas es mayor que la reportada para poblaciones naturales de otros árboles como *Pinus strobus* ($F_{ST} = 0.0054$; Marquardt *et al.*, 2004) y *Quercus petraea* ($F_{ST} = 0.008$; Muir *et al.*, 2004).

Del mismo modo, el valor promedio de R_{ST} (0.045) encontrado en este estudio es mayor que el encontrado en *Carapa Guianensis* ($R_{ST} = 0.041$; Dayanandan *et al.*, 1999) y *Cryptomeria japonica* ($R_{ST} = 0.032$; Takahashi *et al.*, 2005).

Los pares de poblaciones Piedras-Valencia, Piedras-Manuripe y Pariamanu-Pariamarca mostraron una ligera contradicción en cuanto a su diferenciación genética. Mientras que los valores de F_{ST} reflejaron una diferenciación genética significativa entre ellos, el R_{ST} muestra valores bajos y no significativos para los mismos pares. Estas diferencias pueden deberse a la mayor precisión con la que se calcula el R_{ST} , puesto que esta medida toma en cuenta el alto índice de mutación de los microsatélites, mientras que el F_{ST} puede subestimar la diferenciación porque se basa sólo en las frecuencias (Lemes *et al.*, 2003).

A pesar que los resultados de AFC muestran poca estructuración genética entre las localidades, el dendrograma (Figura 10) elaborado en base a la distancia genética de Rousset (1997), muestra la formación de cuatro agrupaciones entre las localidades: a) Manuripe-Piedras-Valencia, b) Pariamanu-Pariamarca c) Pampa Hermosa, y d) Muymanu. Para comprender las relaciones existentes entre estas agrupaciones, tuvimos en cuenta el efecto de la distancia geográfica y la presencia de ríos en la zona de estudio.

A pesar de que los resultados muestran que no existe correlación entre la distancia geográfica y la distancia genética entre todas las poblaciones analizadas, se puede decir que hay una tendencia de que la distancia influye en la diferenciación genética de algunas agrupaciones. Por ejemplo la población Muymanu es la más distante genéticamente y también la más alejada geográficamente de la mayoría de las poblaciones. Es aparente que la menor distancia geográfica entre Pariamanu y Pariamarca estaría reflejada en su gran similitud genética.

Pese a que no existen grandes barreras físicas entre las poblaciones, las distancias genéticas sugieren que existen ciertas restricciones geográficas influenciando estas agrupaciones. Un factor importante podría ser la presencia de los ríos entre las agrupaciones, que por un lado presenta márgenes inundables que son inadecuadas para plantas de tierra firme como la castaña; y por el otro, los ríos de por sí, constituyen barreras insuperables para dispersores como los roedores. Es así que tenemos al Río Muymanu que separa la localidad del mismo nombre del resto de agrupaciones; y el río Piedras que separa al grupo Pariamanu-Pariamarca de los otros tres.

CONCLUSIONES

- ❖ Los microsatélites son marcadores moleculares informativos para el estudio de *Bertholletia excelsa* “castaña” a nivel intra e interpoblacional, revelando un polimorfismo genético expresado en 47 alelos en seis loci distribuidos entre las siete localidades.
- ❖ Las poblaciones de castaña en la región de Madre de Dios, presentan una gran variabilidad genética a nivel intrapoblacional y una insipiente diferenciación a nivel interpoblacional, con un alto flujo de genes entre ellos.
- ❖ No existe correlación entre la distancia geográfica y la distancia genética.
- ❖ Las siete localidades están reunidas en cuatro agrupaciones: Muymanu; Pampa Hermosa; Pariamanu-Pariamarca y Manuripe-Piedras-Valencia.

RECOMENDACIONES

Estos resultados son un primer paso para incentivar y continuar con estudios que enfoquen y aclaren muchas interrogantes en esta especie. En función a los resultados presentados se puede definir algunos puntos que pueden ser abordados a futuro.

- ❖ Para futuros trabajos se podrían utilizar los seis microsatélites restantes creados para castaña *Bertholletia excelsa*, así mismo aumentar el número de muestras (mínimo 30) y poblaciones, incluso incluir poblaciones de castañas bolivianas y brasileras como grupos externos de las poblaciones peruanas.

- ❖ Complementar el presente trabajo con investigaciones genéticas de parentesco, que nos ayuden a conocer mejor la estrategia reproductiva de esta especie.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Araguren-Méndez, J. A.; Román-Bravo, R.; Isea, W.; Villasmil, Y.; Jordana, J. 2005. Los microsatélites (STR's), marcadores moleculares de ADN por excelência para programas de conservación: una revisión. *Archivos Latinoamericanos de Producción Animal*, 13(1): 30-42
- Arnao, E.; Rodríguez, N.; Hinrinsen, P.; Javaro, Y.; Ramis, C.; Pérez-Almeida, I. 2007. Evaluación de la diversidad genética de subespecies de arroz usando marcadores microsatelitales y AFLP. *Agronomía Tropical*, 57(1): 45-50
- Avise, J. C.; Hamrick J. L. 1996. Conservation Genetics: Case Histories from Nature: Chapman & Hall. New York.
- Ayala, F. J.; Kiger, J. A. 1984. Genética moderna. Omega. Barcelona.
- Azofeifa-Delgado, A. 2006. Uso de marcadores moleculares en plantas; aplicaciones en frutales del trópico. *Agronomía Mesoamericana*, 17(2): 221-242
- Balloux, F.; Lugon-Moulini, N. 2002. The estimation of population differentiation with microsatellite markers. *Molecular Ecology*, 11: 155-165
- Barcaccia, G.; Lucchin, M.; Parrini, P. 2003. Characterization of a flint maize (*Zea mays* var. *indurata*) Italian landrace, II. Genetic diversity and relatedness assessed by SSR and Inter-SSR molecular markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 50: 253-271
- Barrett, S.C.H.; Kohn, J.R. 1991. Genetic and evolutionary consequences of small population size in plants: implications for conservation. En: Falk, D. A. and Holsinger, K. E. (eds) *Genetics and Conservation of Rare Plants*, Oxford University Press, Oxford. 3-30 pp.
- Belkhir, K.; Borsa, P.; Chichi, I.; Raufast, N. & Bonhomme, F. 2004. GENETIX 4.05.2, logiciel sous windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire génome, populations, interactions, CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II, Montpellier, France.

- Belkhir, K.; Bonhomme, F. 2002. PARTITION ML: A maximum Likelihood Estimation of the Best Partition of a Sample into Panmictic Units. Disponible en <http://www.univ-montp2.fr/~genetix/partitionml.htm>.
- Borrell, Y.; Álvarez, J.; Vásquez, E.; Sánchez Prado, J.A.; Fernández-Pato, C.; Martínez-Tapia, C.; Blanco, G. 2002. Aplicación de marcadores microsatélites a los programas de cultivo de rodaballo *Scophthalmus Maximus* (L. 1758). *Boletín Instituto Español de Oceanografía*, 18(1-4): 203-209
- Botstein, D.; White, R.; Skolnick, M.; Davis, R. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics*, 32: 314-331
- Brookfield, J.F.Y. 1996. A simple new method for estimating null frequency from heterozygote deficiency. *Molecular Ecology*, 5: 453-455
- Boys, J.; Cherry, M.; Dayanandan, S. 2005. Microsatellite Analysis Reveals Genetically Distinct Populations of Red Pine (*Pinus resinosa*, Pinaceae). *American Journal of Botany*, 92(5): 833-841
- Camargo, P.B.D.; Salomao, R.P.; Trumbore, S.; Martinelli, L.A. 1994. How old are large Brazil-nut trees (*Bertholletia excelsa*) in the Amazon? *Scientia Agricola*, 51: 389-391
- Chase, M. ; Kesseli, R. ; Bawa, K. 1996. Microsatellite markers for population and conservation genetics of Tropical Trees. *American Journal of Botany*, 83(1) : 51-57
- Chapuis, M.P.; Estoup, A. 2007. Microsatellite Null Alleles and Estimation of Population Differentiation. *Molecular Biology Evolution*, 24(3): 621-631
- Chunhieng, T.; Gou, T.; Piombo, G.; Pioch, D.; Brochier, J.; Montet, D. 2004. Recent analysis of the composition of Brazil nut *Bertholletia excelsa*. *Bois et forêts des tropiques*, 280(2): 91-98
- Cole, C.T. 2005. Allelic and population variation of microsatellite loci in aspen (*Populus tremuloides*). *New Phytologist*, 167(1): 155-164
- Corvera, R.; Arcos, M.S. 2006. Manual Técnico Buenas prácticas de cultivo en castaña. IIAP. Puerto Maldonado-Perú.

- Dayanandan, S., Dole, J.; Bawa, K.; Kesseli, R. 1999. Population structure delineated with microsatellite markers in fragmented populations of a tropical tree, *Carapa guianensis* (Meliaceae). *Molecular Ecology*, 8:1585-1592
- Dressler, R.L. 1982. Biology of the Orchid Bees (Euglossini). *Annual Review of Ecology and Systematics*. 13: 373-394
- Doyle, J.J.; Doyle J.L. 1987. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12: 13-15
- Dupanloup, I.; Schneider, S.; Excoffier, L. 2002. A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations. *Molecular Ecology*, 11: 2571-2581
- Echt, C.S.; May-Marquardt, P.; Hsieh, M.; Zahorchak, R. 1996. Characterization of microsatellite markers in eastern white pine. *Genome*, 39: 1102-1108
- Elias, L.G.; Bressani, R. The Nutritive Value of the Brazil Nut Oil. 1960. *The Journal of the American Oil Chemists' Society*, 38: 450-452
- Estoup, A.; Jarne, P.; Cornuet, J.M. 2002. Homoplasy and mutation model at microsatellite loci and their consequences for population genetics analysis. *Molecular Ecology*, 11: 1591-1604.
- Excoffier, L.; Smouse, P.; Quattro, J.M. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: an application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131: 479-491.
- Frankham, R.; Ballou, J. D. and Briscoe, D. A. 2008. Fundamentos de Genética da Conservação. Sociedade Brasileira de Genética. 280pp.
- Ferreira, M.; Grattapaglia, D. 1998. Introducción al uso de Marcadores Moleculares en el Análisis Genético. EMBRAPA, Brasilia, Brasil.
- Fernández-Palacios, O.; Pérez de Paz, J.; Febles, R.; Caujape-Castells, J. 2004. Diversidad genética en *Parolinia*: *P. glabriusula* y *P. platypetala* (Brassicaceae: Matthioleae). *Bot. Macaronesica*, 25: 143-160.
- Felsenstein J. 1993. PHYLIP (Phylogeny inference package) versión 3.05 general information manual. University of Washington, Seattle, Washington. 132pp.

- Futuyma, D. 1986. Evolutionary biology. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts. 223-231 pp.
- Galtier, N.; Depaulis, F.; Barton, N. 2000. Detecting bottlenecks and selective sweeps from DNA sequence polymorphism. *Genetics*, 155: 981-987
- Gazel, C. 1999. Variabilite genétique de formes cavernicoles et epigees de *Trichomycterus* (Teleosteens, Siluriformes) de la region de Torotoro (Potosí-Bolivia). Effect de l' habitat sur la structuration genétique des populations. Universite de Provence Aix-Marseille I.
- Goodman, S.J. 1997. RstCalc: a collection of computer programs for calculatin estimates of genetic differentiation from microsatellite data and determining their significance. *Molecular Ecology*, 6(9): 881-885.
- Guo, X.; Elston, R.C. 1999. Linkage Information Content of Polymorphic Genetic Markers. *Human Heredity*, 49: 112-118
- Hamrick, J.L.; Godt, M.J.; Sherman-Broyles, S.L. 1992. Factor influencing levels of genetic diversity in woody plant species. *New For* 6: 95–124
- Hancock, J. 1999. Microsatellites and other simple sequence: genomic context and mutational mechanisms. En: Goldstein D., Schlotterer C. (eds.). Microsatellites evolution and applications, Oxford University Press, New York, pp. 1-10.
- Hardy, O.J.; Charbonnel, N.; Fréville, H. ; Heuertz, M. 2003. Microsatellite Allele Sizes : A Simple Test to Assess Their Significance on Genetic Differentiation. *Genetics*, 163:1467-1482
- Hartl, D. & Clark, A. 1997. Principles of population genetics. Sinauer Associates, Inc. Publishers Sunderland, Massachusetts, USA. 683 p.
- INRENA. 2003. Plan Maestro 2004-2008 Reserva Nacional Tambopata. Puerto Maldonado, Perú. p. 54-62.
- Janzen, D.H. 1971. Euglossine Bees as Long-Distance Pollinators of Tropical Plants. *Science*, 171(3967): 203-205
- Jarne, P.; Lagoda, P.J.L. 1996. Microsatellites, from molecules to populations and back. *TREE*. 11(10):424-429
- Jiménez, J.F.; Sánchez-Gómez, P.; Martínez, J.F.; Molins, A.; Rosselló, J.A. 2005. Variabilidad genética de *Pinus nigra* subsp. *salzmannii* en la Región Murcia mediante microsatélites cloroplásticos. *Anales de Biología*, 27: 105-112

- Jones, R.C.; Steane, D.A.; Potts, B.M.; Vaillancourt, R.E. 2001. Microsatellite and morphological analysis of *Eucalyptus globules* populations. *Canadian Journal of Forest Research*, 32: 59-66
- Kainer, K.A.; Duryea, M.L.; Costa de Macedo, N.; Williams, K. 1998. Brazil Nut Seedling Establishment and Autecology in Extractive Reserves of Acre, Brazil. *Ecological Applications*, 8(2): 397-410
- Kalliola, R.; Puhakka, M.; Danjoy, W. 1993. Amazonía Peruana, vegetación húmeda tropical en el llano subandino. Proyecto Amazonía, Universidad de Turku, Turku, Finlandia. 265 p.
- Kanashiro, M.; Harris, S.A.; Simons, A. 1997. RAPD diversity in Brazil nut *Bertholletia excelsa* (Hunb. & Bonpl.: Lecythidaceae). *Silvae Genetica*, 46: 219–223
- Karp, A.; Kresovich, S.; Bhat, K.V.; Ayad, W.G.; Hodgkin, T. 1997. Molecular tools in plant genetic resources: A guide to the technologies. IPGRI. Rome-Italy.
- Karp, A.; Isaac, P.G.; Ingram, D.S. 2001. Molecular tools for screening biodiversity. Kluwer Academic Publishers. Netherlands. p. 389-393.
- Kimura, H.; Crow, J.F. 1964. The number of alleles that can be maintained in a finite population. *Genetics*, 49: 725-738
- Lawrence, A.; Phillips, O.L.; Reategui Ismodes, A.; Lopez, M.; Rose, S.; Wood, D.; Farfan, A.J. 2005. Local values for harvested forest plants in Madre de Dios, Peru: towards a more contextualized interpretation of quantitative ethnobotanical data. *Biodiversity and Conservation*, 14: 45-79
- Lemes, M.R.; Gribel, R.; Proctor, J.; Grattapaglia, D. 2003. Population genetic structure of mahogany (*Swietenia macrophylla* King, Meliaceae) across the Brazilian Amazon, based on variation at microsatellite loci: implications for conservation. *Molecular Ecology*, 12: 2875-2883
- Maniatis, T.; Fritsch, E.F.; Sambrook, A. 1989. Molecular cloning a laboratory manual. Cold spring harbor laboratory. Second Edition. New York. 6-60 pp.

- Marquardt, P.E.; Epperson, B.Y. 2004. Spatial and population genetic structure of microsatellites in white pine. *Molecular Ecology*, 13: 3305-3315
- Michalakis, Y.; Excoffier, L. 1996. A Generic Estimation of Population Subdivision Using Distances Between Alleles With Special Reference for Microsatellite Loci. *Genetics*, 142: 1061-1064
- Moegenburg, S.M.; Levey, D.J. 2002. Prospects for conserving biodiversity in Amazonian extractive reserves. *Ecology Letters*, 5: 320–324
- Mori, S. A. 1992. The Brazil Nut Industry - Past, Present, and Future. En: Plotkin, M. y Famolare, L. (eds.) *Sustainable harvest and marketing of rainforest products*. Island Press, Washington D.C. p. 241-251.
- Mori, S. A. 1995. La Nuez del Brazil. Institute of Systematic Botany, The New York Botanical Garden, Bronx, New York. *Etnobotanica* No 5.
- Motta, M. 2002. Reproductive phenology and pollination of the brazil nut tree (*Bertholletia excelsa* Humb. & Bonpl. Lecythidaceae) in Eastern Amazonia. En: Kevan P & Imperatriz Fonseca VL (eds) - *Pollinating Bees - The Conservation Link Between Agriculture and Nature* - Ministry of Environment / Brasília. p. 245-254.
- Muir, G.; Lowe, A.J.; Fleming, C.C.; Vogl, C. 2004. High Nuclear Genetic Diversity, High Levels of Outcrossing and Low Differentiation Among Remnant Populations of *Quercus petraea* at the Margin of its Range in Ireland. *Annals of Botany*, 93: 691-697
- Ohsako, T.; Ohgushi, T.; Motosugi, H.; Oka, K. 2008. Microsatellite variability within and among local landrace populations of tea, *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze, in Kyoto, Japan. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 55:1047-1053
- Orell, M.; Latí, K.; Koivula, K.; Rytönen, S.; Welling, P. 1999. Immigration and gene flow in a northern willow tit (*Parus montanus*) population. Department of biology, Finland. 12: 283-295 p.
- Page, R.D.M. 1996. TREEVIEW. Tree drawing software for Apple Macintosh and Microsoft Windows. Division of Environmental and Evolutionary Biology, Institute of Biomedical and Life Sciences, University of Glasgow. Glasgow, Scotland, UK.

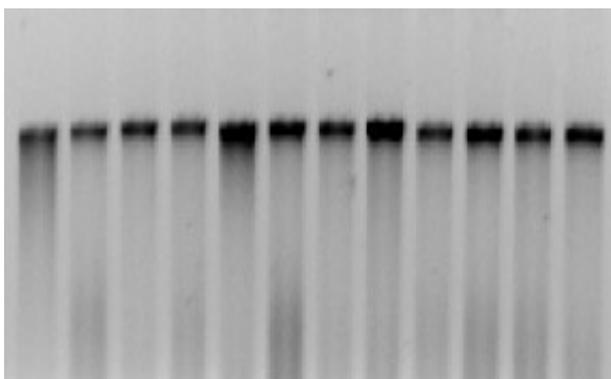
- Palacios, N.; Burtin, D.; Leech, M. 2004. Molecular biology, a tool for bioprospection of plants secondary metabolismo in Colombia. *Revista Colombiana de biotecnología*, 6(2): 67-77
- Pastor, S. 2004. Manejo de la Biotecnología Apropriada para Pequeños Productores: Estudio de Caso – Perú. REDBIO / FAO. Lima – Peru. p. 42-43.
- Peakall, R.; Smouse, P.E. 2005. GenAIEx V6: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. Australian National University, Canberra. Disponible via <http://www.anu.edu.au/BoZo/GenAIEx>.
- Pemberton, J.M.; Slate, J.; Bancroft, D.R.; Barret, J. A. Arret, J.A. 1995. Nonamplifying alleles at microsatellite loci: A caution for parentage and population studies. *Molecular Ecology*, 4:249-52.
- Peres, C.A.; Schiesari, L.C.; Dias-Leme, C.L. 1997. Vertebrate Predation of Brazil-Nuts (*Bertholletia excelsa*, Lecythidaceae), an Agouti-Dispersed Amazonian Seed Crop: A Test of the Escape Hypothesis. *Journal of Tropical Ecology*, 13(1): 69-79
- Peres, C.A.; Baider, C. 1997. Seed Dispersal, Spatial Distribution and Population Structure of Brazilnut Trees (*Bertholletia excelsa*) in Southeastern Amazonia. *Journal of Tropical Ecology*, 13(4): 595-616
- Rajesh, M.K.; Nagarajan, P.; Jerard, B.A.; Arunachalam, V.; Dhanapal, R. 2008. *Current Science*, 94(12): 1627-1631
- Ramírez Chávez, J. 2006. Experiencia de Manejo Sostenible de la Castaña (*Bertholletia excelsa*) el Parque Nacional Bahuaja Sonene y Reserva Nacional Tambopata - Madre de Dios Perú. Boletín IFP Fundación EQUITAS. Especial N°2 | LSJ 11 – Oaxaca.
- Reis A.M.; Braga A.C.; Lemes M.R.; Gribel R.; Collevatti R.G. 2008. Development and characterization of microsatellite markers for the Brazil nut tree *Bertholletia excelsa* Humb. & Bonpl. (Lecythidaceae). *Molecular Ecology Resources*, 9(3): 920-923
- Rousset, F. 1997. Genetic differentiation and estimation of gene flow from *F*-statistics under isolation by distance. *Genetics*, 145: 1219–1228

- Slatkin, M. 1994. Gene flow and population structure. En *Ecological Genetics*, Editado por L. Real. Princeton
- Slatkin, M. 1985. Rare alleles as indicators of gene flow. *Evolution*, 39: 12
- Sunnucks, Paul. 2000. Efficient genetic markers for population biology. *TREE*, 15(5): 199-203
- Takahashi, T.; Tani, N.; Taira, H.; Tsumura, Y. 2005. Microsatellite markers reveal high allelic variation in natural populations of *Cryptomeria japonica* near refugial areas of the last glacial period. *Journal of Plant Resource*, 118: 83-90
- Thomson, C.; Chisholm A.; McLachlan, S.; Campbell, J. 2008. Brazil nuts: an effective way to improve selenium status. *The Medical Journal of Medical Nutrition*. 87: 379-84
- Tonhasca, A. Jr.; Blackmer, J.L.; Albuquerque, G.S. 2002. Abundance and Diversity of Euglossine Bees in the Fragmented Landscape of the Brazilian Atlantic Forest. *Biotropica*. 34(3): 416-422
- Wahid, N.; Naydenov, K.D.; Kamari, S.; Boulli, A.; Tremblay, F. 2010. Genetic structure of *Pinus pinaster* Ait. Populations in Morocco revealed by nuclear microsatellites. *Biochemical Systematics and Ecology*, 38:73-82
- Weir, B.S. & Cockerham, C. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 38: 1358-1370
- Weir, B.S. 1991. Genetic data analysis. Sinauer, Sunderland, MA.
- Wickens, G.E. 1995. Edible nuts. Non-wood Forest Products 5. Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAO. 197p.
- Young, W. J. 1911. The Brazil Nut. *Botanical Gazette*, 52(3): 226-231
- Zuidema, P.; Boot, R. 2002. Demography of the Brazil Nut Tree (*Bertholletia excelsa*) in the Bolivian Amazon: Impact of Seed Extraction on Recruitment and Population Dynamics. *Tropical Ecology*, 18: 1-31

ANEXOS

ANEXO 1: ELECTROFORESIS DE LA EXTRACCIÓN DE ADN DE *Bertholletia excelsa* “CASTAÑA”

Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% mostrando las bandas de ADN total extraído del tejido foliar de 12 individuos de *Bertholletia excelsa* “castaña” del departamento de Madre de Dios.



ANEXO 2: AMPLIFICACIÓN DE ADN DE *Bertholletia excelsa* “CASTAÑA” vía SSR-PCR

2A. Condiciones para la amplificación de todos los primers

Premix	[] inicial	[] final	Cantidad unitaria
MgCl ₂	25 mM	1.5 mM	0.6
Buffer	5 X	1 X	2.0
Primer Bex F	10 µM	0.4 µM	0.4
Primer Bex R	10 µM	0.4 µM	0.4
dNTPmix	10 mM	0.2 mM	0.2
Taq	5 U/µl	0.04 U/µl	0.08
Total Premix	—————→		3.68
Agua	-	-	5.32
ADN	-	-	1.0
Total	—————→		10.0

2B. Condiciones de Alineamiento para la PCR

PRE - PCR	PCR			POST - PCR		
1	2	3	4	5	6	7
96.0 °C 02:00 min	94.0 °C 01:00 min	56.8 °C 01:00 min	72.0 °C 01:00 min	72.0 °C 30:00min	4.0 °C ∞	F I N A L
1 Ciclo	35 Ciclos			1 Ciclo		

Termociclador Eppendorf utilizado para la PCR



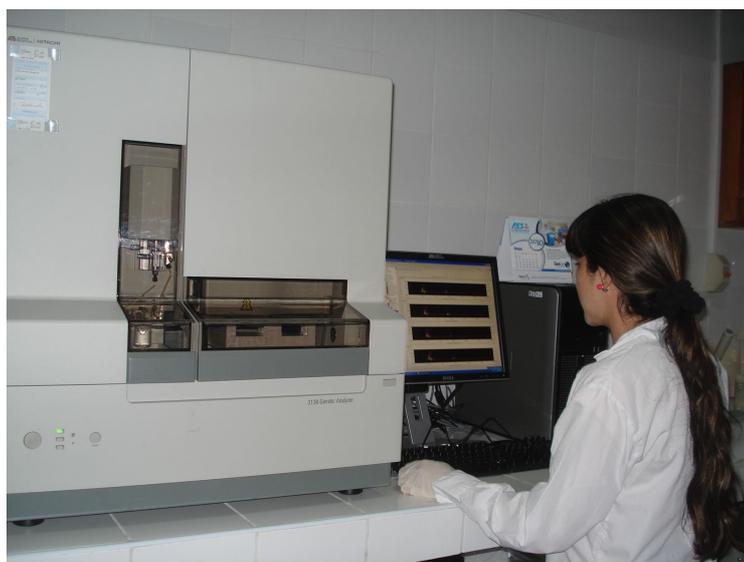
2C. Electroforesis en gel de agarosa al 2% mostrando las bandas de ADN amplificadas mediante marcadores microsatélites de 10 individuos de *Bertholletia excelsa* "castaña" del departamento de Madre de Dios.



ANEXO 3: CANTIDAD DE REACTIVOS EMPLEADOS EN LA LECTURA DE LAS REGIONES MICROSATÉLITES DE *Bertholletia excelsa* “CASTAÑA” EN EL ANALIZADOR GENÉTICO ABI3130

Reactivos	Cantidad(μ l)
Formamida	8.6
ROX	0.4
Productos de PCR	1.0
Total	10

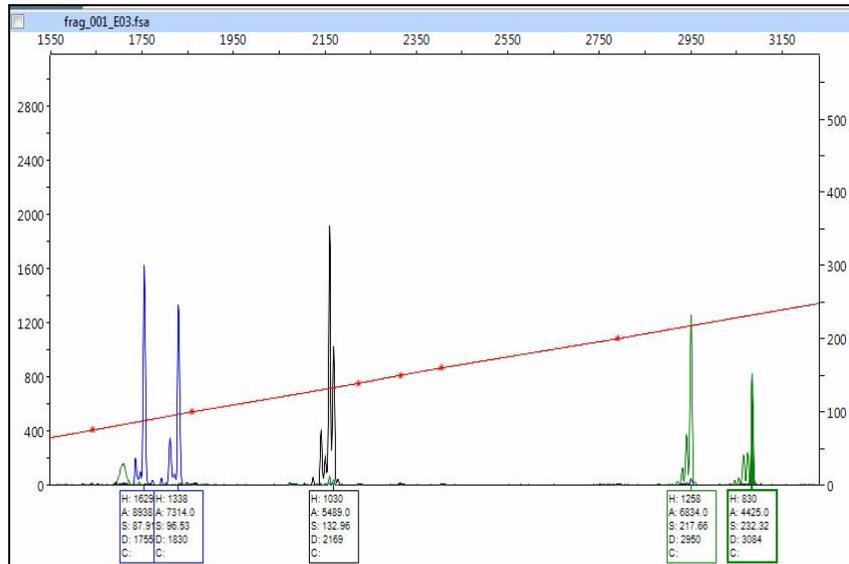
Analizador genético (Applied Biosystems) 3130



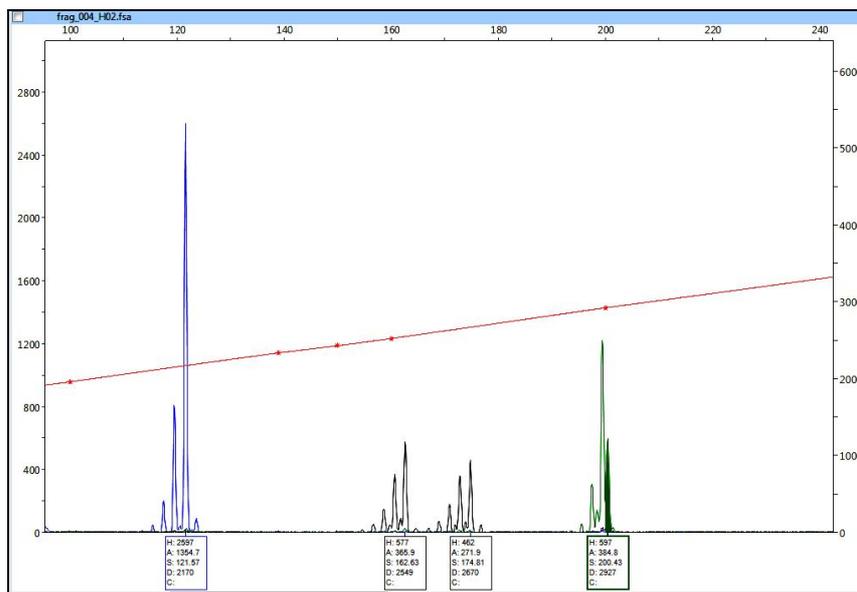
ANEXO 4: PANELES (TRIPLEX)

Electroferograma mostrando los picos con los fragmentos de ADN microsatélite obtenidos en el analizador genético ABI 3130 para *Bertholletia excelsa* “castaña”.

Paneles (triplex) empleados en la lectura de los primers Bex03, Bex22, Bex01.



Paneles (triplex) empleados en la lectura de los primers Bex09, Bex30, Bex37.



ANEXO 5: PLANILLA DE ALELOS POR CADA LOCALIDAD Y CADA MICROSATÉLITE

PROYECTO: Evaluación de la variabilidad genética de *Bertholletia excelsa* "castaña" mediante marcadores microsátélites

Localidad: Madre de Dios, **Año de colecta:** 2009, **Código:** del banco de muestras del Ing. Corvera

N°	LOCALIDAD	CODIGO	Lectura											
			Bex03		Bex22		Bex01		Bex09		Bex30		Bex37	
			FAM - Azul 92 - 106		NED - Amarillo 118 - 136		HEX - Verde 210 - 248		FAM - Azul 98 - 138		NED - Amarillo 130 - 170		HEX - Verde 176 - 204	
1	RIO PIEDRAS	DPQ01	96	102	133	161	218	242	116	122	162	174	200	212
2		FMY01	96	96	133	135	218	218	116	134	158	162	202	210
3		FMY02	96	102	133	133	218	218	116	128	162	162	196	210
4		FMY03	94	96	131	133	230	242	134	134	162	162	202	212
5		OAB01	94	102	131	133	218	230	122	122	130	158	200	208
6		OAB02	96	102	125	137	220	230	128	134	158	162	200	200
7		OAB03	94	96	133	137	218	232	116	122	162	162	200	200
8		OAB04	88	96	137	143	218	218	122	130	158	162	200	200
9		RUM01	102	102	125	131	218	218	116	116	162	162	208	212
10		RUM02	96	96	131	133	218	218	116	122	172	174	200	200
11		RUM03	96	96	133	133	218	220	116	116	158	162	200	208
12		RUM04	96	102	131	133	218	230	116	116	158	162	196	208
13		EHS01	96	102	137	137	218	242	116	116	162	162	200	212
14		EHS02	94	102	125	137	218	238	130	132	142	162	208	208
15		CFS01	88	96	131	133	218	218	122	128	130	162	200	212
16		CFS02	102	102	135	137	218	218	116	130	162	174	208	212
17		JFR01	94	96	133	137	218	232	122	134	130	174	200	208
18		JFR02	88	96	133	133	220	242	122	134	162	174	200	212
19		JFR03	96	96	133	137	220	232	122	122	160	164	200	212
20		JFR04	94	96	133	137	220	220	122	122	162	162	200	200
21		FQN01	96	102	137	137	218	242	116	122	162	174	200	208
22		FQN02	88	94	133	137	218	220	116	132	162	162	200	206

Continuación Anexo 5...

N°	LOCALIDAD	CÓDIGO	Lectura											
			Bex03		Bex22		Bex01		Bex09		Bex30		Bex37	
			FAM - Azul 92 - 106	NED - Amarillo 118 - 136	HEX - Verde 210 - 248	FAM - Azul 98 - 138	NED - Amarillo 130 - 170	HEX - Verde 176 - 204						
23		FQN03	88	96	125	143	232	242	122	132	162	174	200	200
24		FQN04	94	96	133	161	230	232	116	132	162	164	200	200
25	LAGO VALENCIA	AVB01	88	94	133	135	218	218	116	122	162	164	200	210
26		CMH01	88	96	125	133	218	242	116	116	162	174	200	212
27		CMH02	94	94	133	137	218	218	116	122	162	162	200	212
28		CMH03	96	102	133	133	218	218	122	130	174	174	208	214
29		CMH04	88	102	125	137	218	218	116	130	162	162	200	214
30		HGK01	88	96	133	133	218	232	122	128	162	174	208	212
31		HGK02	94	96	137	161	218	232	116	130	158	162	200	214
32		HGK03	88	102	125	133	218	232	116	128	162	162	200	212
33		SCCH01	102	102	133	135	218	232	130	134	130	146	200	200
34		FLP01	94	96	133	133	218	242	116	130	162	162	200	212
35		FLP02	102	102	125	133	218	232	122	130	162	174	200	214
36		FLP03	94	94	133	143	218	218	130	134	162	162	200	212
37		VDP01	96	96	133	133	218	218	116	130	130	162	200	212
38		VDP02	94	102	131	143	218	218	122	122	162	162	200	208
39		VDP03	96	102	131	133	218	218	122	130	142	162	200	200
40		VDP04	94	96	125	137	230	230	122	130	142	162	208	212
41		JCJ01	94	102	131	133	218	218	122	130	130	162	200	212
42		JCJ02	88	102	133	137	218	218	122	130	142	162	206	208
43		JCJ03	96	96	133	133	220	232	122	134	146	162	210	212
44		JCJ04	94	96	133	135	218	218	116	122	162	164	200	212
45		MHL01	94	96	131	133	230	242	130	134	146	174	208	210

Continuación Anexo 5...

N°	LOCALIDAD	CÓDIGO	Lectura											
			Bex03		Bex22		Bex01		Bex09		Bex30		Bex37	
			FAM - Azul 92 - 106		NED - Amarillo 118 - 136		HEX - Verde 210 - 248		FAM - Azul 98 - 138		NED - Amarillo 130 - 170		HEX - Verde 176 - 204	
46		MHL02	88	96	131	133	218	218	116	134	162	174	200	208
47		HCF01	94	96	133	137	218	230	122	134	162	164	208	212
48	PAMPA HERMOSA	EQCH01	94	102	133	135	218	218	116	130	130	174	200	212
49		CBV01	96	102	133	137	218	218	122	122	162	174	200	200
50		CBV02	88	96	143	161	218	218	122	122	162	162	200	208
51		CBV03	94	94	131	137	218	218	122	122	142	174	200	208
52		GPD01	94	94	133	133	218	220	116	122	162	162	208	208
53		JCHV01	94	94	133	137	218	220	116	122	146	162	208	212
54		JCHV02	94	96	133	137	218	218	122	128	158	162	200	212
55		JCHV03	94	96	137	143	218	218	122	130	130	162	208	208
56		PQQ01	96	102	133	135	218	242	130	134	164	164	200	210
57		GFC01	94	96	131	133	218	242	130	130	162	162	210	210
58		MRB01	96	96	137	137	218	242	116	130	142	162	200	210
59		MRB02	94	96	133	133	218	242	130	130	162	174	208	212
60		RNPM01	96	96	133	161	218	242	122	130	130	162	200	210
61		RNPM02	94	94	133	161	220	220	122	130	142	162	200	208
62		ICG01	94	102	133	133	218	238	116	116	142	162	200	212
63		ICG02	96	102	133	133	218	242	116	116	162	162	210	210
64		MBV01	96	102	137	143	218	218	122	130	130	162	200	210
65		JFC01	88	102	131	133	218	218	116	116	162	174	200	210
66	UFCH01	96	102	137	143	218	218	130	134	162	162	200	200	
67	UFCH02	96	102	133	133	218	242	122	128	162	162	200	200	
68	UFCH03	102	102	133	133	218	238	116	130	162	162	200	200	

Continuación Anexo 5...

N°	LOCALIDAD	CÓDIGO	Lectura											
			Bex03		Bex22		Bex01		Bex09		Bex30		Bex37	
			FAM - Azul 92 - 106		NED - Amarillo 118 - 136		HEX - Verde 210 - 248		FAM - Azul 98 - 138		NED - Amarillo 130 - 170		HEX - Verde 176 - 204	
69		CEL01	94	102	133	137	218	218	116	116	146	162	200	212
70		CEL02	94	96	137	161	220	220	116	122	158	164	200	208
71	RIO MANURIFE	AAL01	94	96	133	137	218	232	116	130	130	162	200	208
72		AAL02	94	102	133	137	218	218	116	122	162	174	200	200
73		CCR01	96	96	133	137	218	218	122	130	130	162	208	212
74		CCR02	96	96	133	135	218	242	130	130	162	162	200	208
75		CSH01	88	94	131	133	218	242	122	128	162	162	196	200
76		CSH02	94	96	131	133	218	220	122	122	162	162	196	200
77		HPN01	96	102	131	133	218	218	122	130	162	162	200	208
78		HPN02	88	102	131	137	218	218	128	130	162	162	200	208
79		HPN03	94	96	133	135	218	230	116	130	162	174	190	212
80		HPN04	94	96	131	135	218	230	116	130	158	174	212	212
81		JAO01	102	102	137	151	218	218	122	134	162	162	200	200
82		JBH01	96	102	137	137	218	218	122	134	158	162	200	210
83		MCN01	96	102	133	137	218	220	116	134	162	162	200	208
84		NMM01	94	94	131	133	218	232	122	122	158	162	200	208
85		NMM02	94	94	133	137	218	230	116	122	158	162	200	208
86		PQR01	96	96	133	133	218	218	122	130	142	174	200	200
87		PQR02	96	96	125	135	218	218	130	130	130	158	200	200
88		PQR03	88	102	133	133	218	218	116	130	158	162	200	200
89		RLQ01	94	94	125	137	218	220	116	116	130	158	200	210
90		RLQ02	88	94	125	131	218	218	116	116	162	174	200	208
91		RLQ03	88	94	125	133	218	242	116	122	162	162	200	208

Continuación Anexo 5...

N°	LOCALIDAD	CODIGO	Lectura											
			Bex03		Bex22		Bex01		Bex09		Bex30		Bex37	
			FAM - Azul 92 - 106		NED - Amarillo 118 - 136		HEX - Verde 210 - 248		FAM - Azul 98 - 138		NED - Amarillo 130 - 170		HEX - Verde 176 - 204	
92		FTH01	96	102	133	135	218	220	116	116	158	158	200	212
93		HAP01	96	96	125	133	218	232	130	130	162	174	196	200
94		JCC02	94	96	133	133	218	218	122	134	158	162	200	210
95		JCC03	96	102	133	137	218	218	122	134	146	162	200	212
96		VSR01	96	102	133	137	218	232	122	130	130	162	210	212
97		ANG01	88	96	131	135	218	218	116	128	158	162	202	210
98	RIO MUYMANU	GCR01	94	102	133	133	218	242	116	128	130	130	196	200
99		GCR02	96	102	131	143	218	242	130	134	158	162	200	208
100		GCR03	96	102	131	131	218	218	122	130	130	162	200	208
101		LSB01	102	102	131	133	218	218	116	122	142	164	190	200
102		LCQ01	94	102	137	143	218	230	130	134	160	162	190	200
103		BSA01	96	102	135	137	218	218	116	122	162	162	200	208
104		BSA02	94	96	133	161	218	230	116	116	162	174	208	212
105		BSA03	96	102	133	133	218	232	128	134	162	162	200	212
106		DRG01	94	96	133	137	218	218	130	130	162	162	190	190
107		JPQ01	102	102	133	137	242	242	122	134	130	158	190	200
108		JPQ02	94	96	133	137	218	252	122	122	130	162	190	204
109		JPQ03	94	96	131	133	218	218	122	122	162	174	190	210
110		JEL01	94	94	133	143	218	218	122	122	162	174	208	208
111		JEL02	96	96	133	137	218	218	130	134	146	174	200	210
112		MGO01	94	102	131	137	218	232	122	128	162	162	200	208
113		RPM01	88	94	133	135	218	218	122	130	158	158	200	200
114		RPM02	94	96	133	133	218	218	130	130	158	162	200	200

Continuación Anexo 5...

N°	LOCALIDAD	CODIGO	Lectura											
			Bex03		Bex22		Bex01		Bex09		Bex30		Bex37	
			FAM - Azul 92 - 106		NED - Amarillo 118 - 136		HEX - Verde 210 - 248		FAM - Azul 98 - 138		NED - Amarillo 130 - 170		HEX - Verde 176 - 204	
115		RPM03	96	102	133	163	218	242	116	134	162	162	208	212
116		ISH01	96	96	133	133	218	242	122	134	162	162	208	212
117		ISH02	96	102	131	133	218	242	116	116	146	162	200	208
118		AGR01	96	102	131	133	218	218	130	134	162	174	200	218
119		AGR02	96	102	133	137	218	218	116	130	162	162	200	200
120		ASS01	94	102	133	133	218	232	116	130	130	162	208	210
121	ASS02	94	94	133	133	218	232	128	130	162	174	200	208	
122	ATG01	94	96	133	133	218	218	116	116	130	162	208	212	
123	ATG02	94	102	133	137	218	238	116	132	162	162	208	212	
124	ATG03	88	96	135	137	218	242	134	134	158	162	200	212	
125	FNG01	94	94	133	133	218	218	116	134	162	176	208	212	
126	FNG02	96	96	133	137	218	232	132	134	146	174	200	208	
127	JMCH01	88	102	125	133	218	238	116	132	158	162	200	208	
128	MBP01	88	96	133	133	218	218	130	130	130	146	200	208	
129	MBP02	88	88	133	137	230	242	122	122	162	162	200	212	
130	MBP03	94	96	137	137	218	232	116	132	130	158	200	208	
131	MBP04	94	96	125	137	218	218	116	122	158	162	200	208	
132	JAA01	94	96	125	133	218	220	122	122	130	146	208	210	
133	JAA02	88	94	125	137	218	230	128	128	158	174	200	214	
134	JAA03	88	96	125	137	218	220	128	130	130	162	208	208	
135	AMM01	88	88	125	133	218	218	116	130	158	162	208	212	
136	AMM02	94	94	125	133	218	232	130	130	158	158	200	200	
137	AMM03	96	96	133	137	218	242	130	130	130	162	200	208	
138	MHR01	88	96	133	133	218	218	130	130	158	162	200	200	

Continuación Anexo 5...

N°	LOCALIDAD	CODIGO	Lectura											
			Bex03		Bex22		Bex01		Bex09		Bex30		Bex37	
			FAM - Azul 92 - 106	NED - Amarillo 118 - 136	HEX - Verde 210 - 248	FAM - Azul 98 - 138	NED - Amarillo 130 - 170	HEX - Verde 176 - 204						
139		MHR02	088	088	133	137	218	218	116	130	158	162	200	208
140		JCN01	094	096	133	133	220	220	116	130	130	174	200	200
141		JCN02	094	096	133	133	218	218	116	122	158	174	200	208
142		JCN03	094	096	125	137	218	218	122	130	158	162	208	208
143	RIO PARIAMARCA	CGG01	094	102	143	143	218	218	132	134	162	162	200	212
144		CGG02	096	096	133	133	218	218	122	130	146	162	210	214
145		CGG03	088	096	133	143	218	218	122	130	130	162	200	212
146		CGG04	094	102	133	133	218	242	116	130	158	162	208	212
147		FCT01	096	102	125	133	220	220	128	130	158	158	200	208
148		NPM01	096	102	133	133	220	238	116	116	130	162	200	210
149		NPM02	094	094	133	133	218	220	122	122	158	158	200	200
150		JGT01	096	102	125	131	238	238	116	130	130	130	208	208
151		JGT02	088	088	137	137	218	218	122	132	130	146	200	208
152		JGT03	088	094	133	133	218	230	122	128	162	162	208	208
153		MLV01	096	096	133	137	218	232	116	128	158	162	208	208
154		MLV02	088	096	133	137	218	218	116	128	158	164	200	212
155		MLV03	088	102	133	137	218	218	116	122	162	162	200	208
156		APS01	096	096	131	133	218	218	116	122	162	162	200	200
157		APS02	088	096	133	133	218	220	116	130	130	162	200	208
158		APS03	096	096	137	137	220	252	122	122	162	162	208	208
159		LHP03	096	096	133	137	218	242	128	130	162	174	200	208
160		JAJ01	096	096	133	133	218	220	116	122	130	162	200	208
161		JAJ02	094	096	125	125	218	238	116	130	162	172	200	208
162		JAJ03	094	102	133	133	218	218	116	130	162	174	200	200
163		ARA01	088	094	125	133	218	232	116	130	158	162	208	208
164		ARA02	088	102	125	133	218	218	130	130	130	162	200	208

Anexo 6: FRECUENCIA ALÉLICA ENCONTRADA EN LOS LOCI MICROSATÉLITES DE *Bertholletia excelsa* "CASTAÑA" DE LOS ESPECÍMENES ANALIZADOS DEL DEPARTAMENTO DE MADRE DE DIOS.

Locus	Alelo	Piedras	Valencia	Pampa Hermosa	Manuripe	Muymanu	Pariamanu	Pariamarca
Bex03	88	0.114	0.125	0.087	0.038	0.042	0.286	0.179
	94	0.227	0.250	0.370	0.212	0.292	0.310	0.232
	96	0.409	0.313	0.435	0.462	0.333	0.357	0.393
	102	0.250	0.313	0.109	0.288	0.333	0.048	0.196
Bex22	125	0.136	0.078	0.022	0.019	0.000	0.190	0.125
	131	0.182	0.094	0.043	0.135	0.250	0.000	0.054
	133	0.432	0.531	0.413	0.481	0.375	0.500	0.554
	135	0.068	0.047	0.043	0.115	0.042	0.024	0.000
	137	0.159	0.156	0.326	0.192	0.208	0.286	0.196
	143	0.000	0.063	0.065	0.000	0.125	0.000	0.071
	151	0.000	0.000	0.000	0.019	0.000	0.000	0.000
	161	0.023	0.031	0.087	0.019	0.000	0.000	0.000
	163	0.000	0.000	0.000	0.019	0.000	0.000	0.000
Bex01	218	0.727	0.688	0.522	0.712	0.750	0.667	0.589
	220	0.068	0.047	0.196	0.038	0.000	0.095	0.143
	230	0.045	0.063	0.022	0.077	0.042	0.048	0.054
	232	0.023	0.094	0.087	0.096	0.000	0.071	0.089
	238	0.023	0.031	0.000	0.000	0.000	0.048	0.071
	242	0.114	0.078	0.174	0.077	0.167	0.071	0.036
	252	0.000	0.000	0.000	0.000	0.042	0.000	0.018
	252	0.000	0.000	0.000	0.000	0.042	0.000	0.018
Bex09	116	0.477	0.328	0.152	0.250	0.125	0.262	0.268
	122	0.205	0.266	0.457	0.250	0.375	0.167	0.268
	128	0.068	0.047	0.022	0.058	0.083	0.071	0.125
	130	0.159	0.250	0.217	0.288	0.250	0.310	0.268
	132	0.023	0.000	0.065	0.000	0.000	0.095	0.036
	134	0.068	0.109	0.087	0.154	0.167	0.095	0.036
	134	0.068	0.109	0.087	0.154	0.167	0.095	0.036

Continuación Anexo 6...

Locus	Alelo	Piedras	Valencia	Pampa Hermosa	Manuripe	Muymanu	Pariamanu	Pariamarca
Bex30	130	0.091	0.063	0.087	0.038	0.208	0.167	0.179
	142	0.045	0.063	0.065	0.000	0.042	0.000	0.000
	146	0.000	0.063	0.022	0.038	0.042	0.071	0.036
	158	0.136	0.031	0.043	0.173	0.125	0.286	0.196
	160	0.000	0.000	0.022	0.000	0.042	0.000	0.000
	162	0.568	0.594	0.500	0.654	0.375	0.357	0.500
	164	0.000	0.063	0.087	0.000	0.042	0.000	0.018
	172	0.023	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.018
	174	0.136	0.125	0.174	0.096	0.125	0.095	0.054
	176	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.024	0.000
Bex37	190	0.000	0.000	0.000	0.019	0.292	0.000	0.000
	196	0.091	0.000	0.000	0.019	0.042	0.000	0.000
	200	0.455	0.453	0.478	0.442	0.292	0.405	0.464
	202	0.045	0.000	0.000	0.000	0.042	0.000	0.000
	204	0.000	0.000	0.000	0.000	0.042	0.000	0.000
	206	0.000	0.016	0.022	0.000	0.000	0.000	0.000
	208	0.205	0.141	0.239	0.250	0.167	0.405	0.393
	210	0.068	0.109	0.130	0.038	0.125	0.024	0.054
	212	0.136	0.219	0.130	0.212	0.000	0.143	0.071
	214	0.000	0.063	0.000	0.000	0.000	0.024	0.018
218	0.000	0.000	0.000	0.019	0.000	0.000	0.000	

ANEXO 7: PARÁMETROS DE DIVERSIDAD GENÉTICA OBTENIDOS PARA SEIS LOCI MICROSATÉLITES DE *Bertholletia excelsa* “CASTAÑA” PROVENIENTE DE SIETE LOCALIDADES DEL DEPARTAMENTO DE MADRE DE DIOS.

La heterocigosidad observada (H_o) en cada localidad varió entre 0.333 (Bex01, Muymanu) y 0.857 (Bex30, Pariamanu) y la esperada (H_e) entre 0.406 (Bex01, Muymanu) y 0.785 (Bex09, Pariamanu). Los valores de F_{IS} variaron entre -0.206 (Bex01) en la localidad Manuripe y 0.294 (Bex09) en los individuos de Pariamanu.

		LOCUS					
LOCALIDADES		Bex03	Bex22	Bex01	Bex09	Bex30	Bex37
Piedras	n	22	22	22	22	22	22
	Na	4	6	6	6	6	6
	H_o	0.636	0.773	0.500	0.591	0.682	0.727
	H_e	0.706	0.731	0.450	0.695	0.629	0.718
	F_{IS}	0.121ns	-0.033ns	-0.087ns	0.172ns	-0.061ns	0.010ns
Valencia	n	32	32	32	32	32	32
	Na	4	7	6	5	7	6
	H_o	0.781	0.719	0.438	0.813	0.656	0.813
	H_e	0.727	0.671	0.505	0.745	0.615	0.711
	F_{IS}	-0.059ns	-0.055ns	0.150ns	-0.075ns	-0.051ns	-0.127ns
Pampa	n	23	23	23	23	23	23
Hermosa	Na	4	7	5	6	8	5
	H_o	0.696	0.739	0.609	0.696	0.739	0.696
	H_e	0.655	0.707	0.651	0.709	0.698	0.680
	F_{IS}	-0.040ns	-0.023ns	0.087ns	0.041ns	-0.037ns	-0.001ns

Abreviaturas: Número de individuos analizados (n), número de alelos encontrados (Na), heterocigosidad observada (H_o), heterocigosidad esperada (H_e), coeficiente de endogamia (F_{IS})
 ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$; ns = no significativo.

Continuación Anexo 7...

		LOCUS					
LOCALIDADES		Bex03	Bex22	Bex01	Bex09	Bex30	Bex37
Manuripe	n	26	26	26	26	26	26
	Na	4	8	5	5	5	7
	H_o	0.731	0.846	0.577	0.731	0.500	0.808
	H_e	0.658	0.699	0.471	0.765	0.530	0.695
	F_{IS}	-0.092ns	-0.192*	-0.206ns	0.064ns	0.077ns	-0.144ns
Muymanu	n	12	12	12	12	12	12
	Na	4	5	4	5	8	7
	H_o	0.667	0.833	0.333	0.667	0.833	0.833
	H_e	0.691	0.736	0.406	0.747	0.778	0.781
	F_{IS}	0.079ns	-0.089ns	0.221ns	0.150ns	-0.028ns	-0.023ns
Pariamanu	n	21	21	21	21	21	21
	Na	4	4	6	6	6	5
	H_o	0.667	0.667	0.524	0.571	0.857	0.762
	H_e	0.693	0.632	0.532	0.785	0.748	0.651
	F_{IS}	0.062ns	-0.031ns	0.039ns	0.294**	-0.122ns	-0.147ns
Pariamarca	n	28	28	28	28	28	28
	Na	4	5	7	6	7	5
	H_o	0.679	0.500	0.571	0.821	0.679	0.607
	H_e	0.721	0.631	0.615	0.767	0.675	0.622
	F_{IS}	0.077ns	0.225ns	0.089ns	-0.053ns	0.013ns	0.042ns

Abreviaturas: Número de individuos analizados (n), número de alelos encontrados (Na), heterocigosidad observada (H_o), heterocigosidad esperada (H_e), coeficiente de endogamia (F_{IS})
 **p< 0.01; *p<0.05; ns = no significativo.