

CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE LOS MORFOTIPOS DE AGUAJE *Mauritia flexuosa* L. F. (ARECACEAE) Y ANALISIS DE LA VARIABILIDAD DE TRES POBLACIONES NATURALES EN LA AMAZONIA PERUANA

Frank ASPAJO¹, Ángel RODRÍGUEZ¹, Mike CORAZÓN-GUIVIN¹, Luis Freitas², Dennis DEL-CASTILLO², Diana CASTRO², Mildred GARCÍA⁴, Jean-François RENNO³, Carmen GARCÍA-DÁVILA²

1 Becario pregrado, IIAP-INCAGRO-LBGM, Iquitos, Perú.

2 Instituto de Investigaciones de la Amazonia Peruana-IIAP, Laboratorio de Biología y Genética Molecular (LBGM), Apartado 784, Iquitos, Perú. cdavila19@yahoo.com

3 Institut de Recherche pour le Développement IRD, Montpellier, France.

4 Universidad Nacional de la Amazonia Peruana-UNAP.

RESUMEN

La variabilidad genética del aguaje *Mauritia flexuosa* L. f. fue evaluada según los morfotipos del fruto (amarillo, color y shambo); y del árbol (normal, enano y dístico); así como entre tres poblaciones naturales del aguaje amarillo de las localidades de Aucayo, Jenaro Herrera y Parinari en la Amazonia peruana; usando el marcador molecular DALP (Amplificación Directa de Polimorfismo de Longitud). Los resultados del análisis factorial de correspondencia (AFC) no muestran diferenciaciones genéticas entre los morfotipos del fruto, lo que es corroborado por los bajos promedios del índice de fijación ($F_{st} = 0.04$) y de la distancia genética ($D = 0.008$). Asimismo, los resultados de AFC entre los morfotipos del tronco, no muestran diferenciación clara entre ellos. Pero, los promedios de índice de fijación ($F_{st} = 0.23$) y distancia genética ($D = 0.27$) indican una mayor diferenciación genética que la encontrada entre los morfotipos del fruto. Estos resultados obtenidos al nivel de nuestros análisis podrían indicar que estos morfotipos son únicamente variaciones fenotípicas que no son marcadas en el genotipo. Los resultados de los análisis genéticos poblacionales (promedios $F_{st} = 0.45$ y distancia genética = 0.68 y AFC) mostraron que las tres poblaciones de aguaje se encuentran bien diferenciadas, pudiendo esto ser atribuido a las grandes distancias geográficas que combinadas a la existencia de ríos entre las poblaciones podrían estar actuando como barreras naturales que restringen el flujo de genes entre ellas.

PALABRAS CLAVE: *Mauritia flexuosa* L. f., DALP, caracterización molecular, morfotipos, variabilidad genética poblacional.

GENETIC CHARACTERIZATION OF THE OF AGUAJE *Mauritia flexuosa* L. F. (ARECACEAE), MORPHOTYPES, AND ANALYSIS OF GENETIC VARIATION OF THREE NATURAL POPULATIONS IN THE PERUVIAN AMAZON

ABSTRACT

The genetic variability of aguaje *Mauritia flexuosa* L. f. morphotypes was evaluated according to fruit (yellow, color and Shambo) and tree (normal, dwarf and couplet), and three natural populations of yellow aguaje (Aucayo, Jenaro Herrera and Parinari locations) in the Peruvian Amazon, using DALP molecular marker (Direct Amplification of Length Polymorphism). The results of correspondence factor analysis (AFC) show no genetic differentiation between morphotypes of the fruit, which is corroborated by the low average fixation index (average $F_{st} = 0.04$) and genetic distance (average $D = 0.008$). Similarly, the results of AFC between the morphotypes of the trunk, show no clear differentiation between them. But the average fixation index (average $F_{st} = 0.23$) and genetic distance (average $D = 0.27$) indicate greater genetic differentiation found among morphotypes of the fruit. These results obtained at the level of our analysis may indicate that these morphotypes are only phenotypic variations that are not marked on the genotype. The results of population genetic analysis (average $F_{st} = 0.45$ and genetic distance = 0.68, and AFC) showed that the three populations the aguaje are well differentiated, this can be attributed to the large geographical distances combined with the existence of rivers among populations could be acting as natural barriers restricting gene flow between them..

KEYWORDS: *Mauritia flexuosa* L. f., DALP, molecular characterization, morphotypes, population genetic variability.

INTRODUCCIÓN

El aguaje *Mauritia flexuosa* L. f. (Linneo, 1781) es una palmera considerada promisorio para el desarrollo sostenido de la Amazonia peruana debido a que posee un elevado potencial económico en los mercados nutracéutico, farmacéutico y alimenticio. También cumple una importante función ecológica y provee servicios ambientales al mitigar el cambio climático secuestrando altos niveles de carbono y proveer alimento a muchas especies de animales en bosques primarios (Kalliola, 1993; INRENA 2000; PRONATURALEZA, 2005; del Castillo *et al.*, 2006; Delgado *et al.*, 2007). Sin embargo, a pesar de poseer estas cualidades, este recurso no está siendo aprovechado de forma sostenible. La sobreexplotación (consumo en Iquitos de aproximadamente 20 t fruto/día) y la tala del árbol para coleccionar sus frutos está ocasionando el declinio de sus poblaciones naturales que podrían inducir problemas de erosión genética, además de un fuerte impacto en la economía de los pobladores que usan este recurso como fuente de ingresos (Bejarano & Piana, 2002; PRONATURALEZA, 2005).

Existe una necesidad de producir información relevante sobre esta especie, que pueda servir de base para la formulación de planes de uso sostenido. Hasta el momento la literatura reporta estudios sobre su biología, ecología y agroforestería (Balick, 1979; Storti, 1993; De Paula, 2001; Bejarano & Piana, 2002; PRONATURALEZA, 2005; del Castillo *et al.*, 2006; Delgado *et al.*, 2007); existiendo escasos estudios moleculares referidos principalmente a establecer las relaciones filogenéticas del aguaje dentro de la familia Arecaceae (Pintaud *et al.*, 2007) y a la búsqueda de marcadores relacionados al sexo (Rengifo, 2008).

En este sentido, el presente trabajo pretende generar información sobre la caracterización molecular de los morfotipos del fruto (color, amarillo y shambo) y del árbol (enano normal y dístico) del aguaje; así como también sobre la variabilidad genética entre tres poblaciones naturales del aguaje amarillo. Evaluados mediante marcadores moleculares DALP (Amplificación Directa de Polimorfismo de Longitud) que generan información sobre la variabilidad global del genoma.

MATERIALES Y MÉTODOS

COLECTA DE MATERIAL BIOLÓGICO

Se colectaron un total de 89 muestras de tejido foliar de plantas de aguaje, 30 de las cuales fueron utilizadas para el estudio de caracterización molecular de los morfotipos amarillo, color y shambo; y 29 muestras en la caracterización genética de los morfotipos del árbol (normal, enano y dístico). Las 30

restantes, procedentes de tres poblaciones naturales: Parinari (río Marañón, UTM 9490154, 18M 556280), Aucayo (río Amazonas, UTM 9574726, 18M 707998) y Jenaro Herrera (río Ucayali, UTM 9457318, 18M 647688), fueron utilizadas en el estudio de la variabilidad genética poblacional de aguaje amarillo (Figura 1).

EXTRACCIÓN Y AMPLIFICACIÓN DEL ADN GENÓMICO

El ADN genómico fue obtenido a partir de 100 mg de tejido foliar mediante el protocolo de extracción CTAB (Doyle & Doyle, 1987). Para la amplificación del ADN vía DALP-PCR, se utilizaron ocho marcadores, formados a partir de combinaciones de un primer reverso (fijo) con cada uno de los ocho primers selectivos (Tabla 1). Las reacciones de amplificación se prepararon en volúmenes finales de 25 µl, conteniendo 2 µl ADN molde (100 ng/µl), 0,375 µl Taq polimerasa (5 U/µl), 5 µl Buffer (5X), 0,75 µl dNTPs (10 mM), 3,1 µl MgCl₂ (25 mM), 2 µl de cada primer (10 mM) y agua ultrapura. Las condiciones de temperatura del PCR fueron: denaturación inicial de 95 °C x 1 min., seguidos de 29 ciclos consistentes de denaturación a 95 °C x 30 seg., hibridación [51 °C (DALP06) y 45,7 °C (DALP07)] x 30 seg., extensión a 72 °C x 30 seg. La amplificación fue verificada inicialmente en geles de agarosa 2% teñidos con bromuro de etidio (1 l / 50 ml de gel), y el análisis de la variabilidad genética se realizó sobre la base de los patrones de bandas observadas en geles de poliacrilamida 6% teñidos mediante el método Rabat (Sambrook & Russell, 1991).

ANÁLISIS DE DATOS

El polimorfismo entre las muestras fue analizado mediante la observación de la presencia o ausencia de las bandas entre los individuos. A partir del cual se realizó una matriz binaria en base a la presencia (1) y ausencia (0) de las bandas diferenciales (polimórficas). El genotipo para cada uno de los individuos fue establecido a partir de la combinación de los perfiles de bandas generadas por cada uno de los primers DALP. Las diferencias genéticas fueron establecidas mediante el Análisis Factorial de Correspondencia (AFC), el índice de fijación F_{st} de Weir & Cockerham (1984). La distancia genética (D) fue calculada mediante la fórmula $D = -\ln(1 - F_{st})$ de Reynolds *et al.* (1983). Estos análisis fueron realizados con ayuda del software GENETIX versión 4.05 (Belkhir *et al.*, 2004), los árboles genéticos utilizados para establecer las relaciones entre los morfotipos y entre las poblaciones dentro del morfotipo amarillo fueron generados con el software PHYLIP versión 3.5 (Felsenstein, 1993) y visualizados con el software TREEVIEW (Page, 1996).



Figura 1. Mapa de ubicación geográfica de las poblaciones naturales de aguaje *Mauritia flexuosa* estudiados en la Amazonia peruana: Aucayo (rio Amazonas), Jenaro Herrera (rio Ucayali) y Parinari (rio Marañón).

Tabla 1. Marcadores DALP (Desmarais, et al., 1998) utilizados en el análisis de los morfotipos y poblaciones de aguaje *Mauritia flexuosa*.

TIPO DE PRIMERS	PRIMERS	SECUENCIA
Primer reverso	DALP R	TTTCACACAGGAAACAGCTATGAC
Primers selectivos	DALP 221	GTTTCCCAGTCACGACGC
	DALP 231	GTTTCCCAGTCACGACAGC
	DALP 232	GTTTCCCAGTCACGACGAC
	DALP 233	GTTTCCCAGTCACGACACG
	DALP 234	GTTTCCCAGTCACGACCAG
	DALP 235	GTTTCCCAGTCACGACCAC
	DALP 241	GTTTCCCAGTCACGACTCAG
	DALP 242	GTTTCCCAGTCACGACTAG

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA DE LOS MORFOTIPOS

De los ocho marcadores DALP utilizados para el estudio de morfotipos, sólo dos (DALP06 y DALP07) resultaron informativos. En el caso de morfotipos del fruto, encontramos elevados niveles de polimorfismo (variación genética) entre los individuos, que fue independiente de las variaciones observadas en el color del fruto. Los resultados obtenidos con el análisis Factorial de Correspondencia (AFC) muestran una fuerte sobreposición entre estos morfotipos (Figura 2), lo que es corroborado por los promedios de F_s (0.04) y distancia ($D = 0.008$) entre los morfotipos (Tabla 2A). Los resultados de AFC (Figura 3) no mostraron una estructuración genética clara entre los morfotipos del tronco (dístico, normal y enano). Pero los promedios del índice de fijación ($F_s = 0.23$) y distancia genética ($D = 0,27$), muestran una mayor diferenciación genética entre los morfotipos del tronco, que lo encontrado entre los morfotipos del fruto. El morfotipo dístico presenta una mayor diferenciación genética con los morfotipos normal y enano (Tabla 2B); en tanto que estos dos últimos presentan una diferenciación genética mucho menor

cuando son comparados entre sí ($F_s = 0.13$, $D = 0.14$). La ausencia de diferencia genética observada entre los morfotipos se podría explicar por la segregación genética de los caracteres dentro de un mismo genoma. En consecuencia son variaciones fenotípicas que no son marcadas en el genotipo al nivel de nuestros análisis. Otra hipótesis sería que un mismo genotipo se expresa de manera diferente a varias condiciones edáficas, topológicas o bióticas (plasticidad fenotípica).

La alta variabilidad genotípica entre individuos dentro de una misma población (por ejemplo la población de Aucayo, de donde provienen las muestras de los morfotipos del fruto) es mantenida por el complejo sistema de reproducción sexual de esta especie (polígamo, dioico o polígamo dioico), el cual facilita la recombinación genética: (Cavalcante, 1991). Además la acción del viento (Raven *et al.*, 1996) y de los insectos en la dispersión del polen; combinada a la dispersión de las semillas por los ungulados, roedores, monos, aves, quelonios y peces (Hiraoka, 1999); va facilitar la reproducción entre individuos genéticamente diferentes, promoviendo la variabilidad intrapoblacional y atenuando la variabilidad entre poblaciones vecinas.

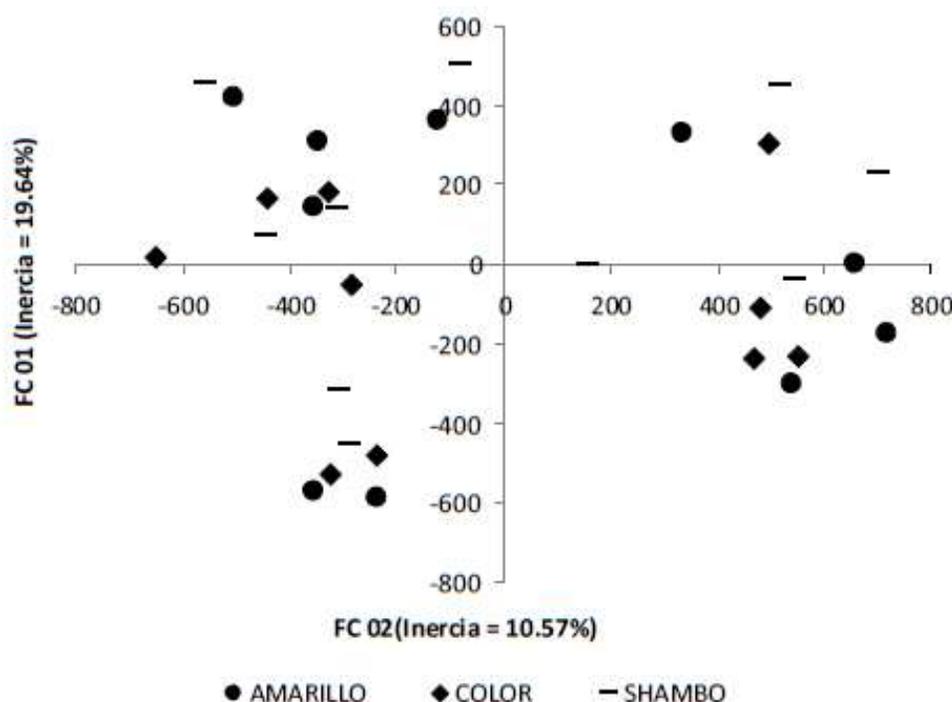


Figura 2. Representación gráfica de los resultados del Análisis Factorial de Correspondencia (AFC), inferidos en función a los genotipos encontrados para los tres morfotipos del fruto de aguaje *Mauritia flexuosa*. Los puntos están distribuidos sobre un plano factorial bidimensional.

Tabla 2. Estimación de los Índices de Fijación (F_{st}) y Distancias genéticas (D) para los diferentes morfotipos de *Mauritia flexuosa*: A) morfotipos del fruto, B) morfotipos del tronco.

MORFOTIPOS	F_{st}	D
(A) Morfotipos del Fruto		
Amarillo - Color	0.00000	0.00000
Amarillo - Shambo	0.00782	0.00795
Color - Shambo	0.00000	0.00000
Promedio	0.00261	0.00265
(B) Morfotipos del árbol Morfotipos		
Enano - Normal	0.13102	0.14044
Enano - Distico	0.24205	0.27714
Normal - Distico	0.32520	0.39333
Promedio	0.23276	0.27030

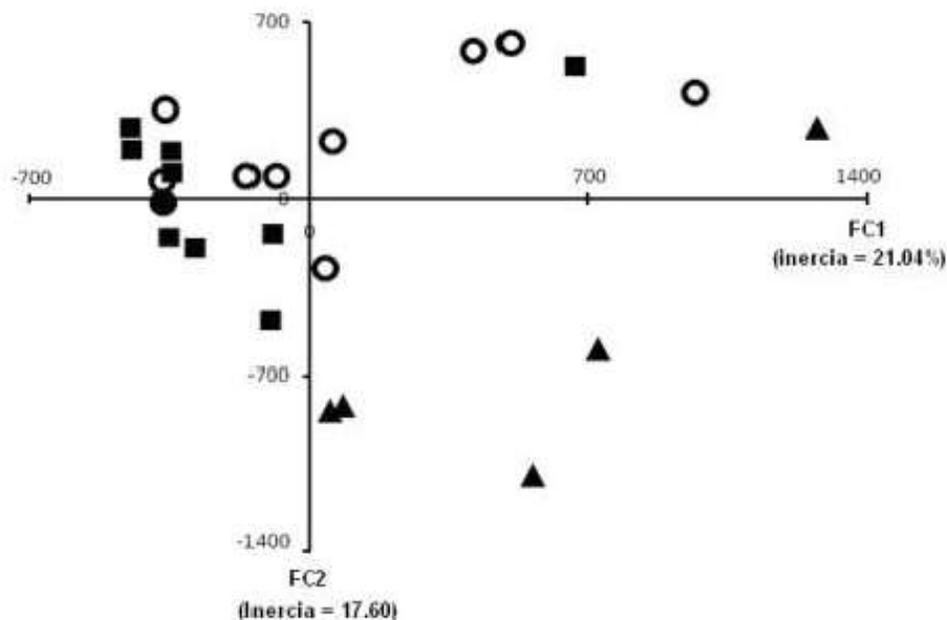


Figura 3. Representación gráfica de los resultados del Análisis Factorial de Correspondencia (AFC), inferidos en función a los genotipos encontrados para los tres morfotipos del árbol de aguaje *Mauritia flexuosa*. Los puntos están distribuidos sobre un plano factorial bidimensional.

RELACIONES FILOGEOGRÁFICAS ENTRE LAS POBLACIONES

El análisis filogeográfico entre las tres poblaciones naturales de aguaje amarillo evaluados mediante el marcador molecular DALP06 muestran elevados niveles de variabilidad genética dentro y entre las poblaciones. En total se encontraron 25 genotipos diferentes. Asimismo, los resultados obtenidos en el AFC (Figura 4) y el dendrograma UPGMA (Figura 5), muestran tres poblaciones bien estructuradas sin sobreposición entre ellas. Esto es reforzado por la ausencia de genotipos compartidos entre las poblaciones, y puede ser explicado por las grandes distancias geográficas y la existencia de los ríos que estarían actuando como barreras naturales, restringiendo el flujo de genes entre las poblaciones. Los resultados además indican que la población de Aucayo presenta una mayor distancia genética respecto a las otras poblaciones (Aucayo - J. Herrera = 0.66130, Aucayo - Parinari = 1.13434) y que las

poblaciones de Jenaro Herrera y Parinari son las más cercanas genética (distancia = 0.21052) y geográficamente (98.37 km). Estas observaciones son corroboradas también por los resultados de F_{st} (Tabla 3), donde se observa que las poblaciones de Jenaro Herrera y Parinari presentan el índice de fijación más bajo ($F_{st} = 0.20962$).

Estos altos niveles de variabilidad genética encontrados dentro de las poblaciones, eran los esperados tratándose de poblaciones naturales de una especie que posee una diversidad de estrategias reproductivas (polígamo, dioico o polígamo dioico y xenógamo) y una amplia gama de agentes polinizadores y dispersores de semillas que contribuyen al mantenimiento de la diversidad genética, disminuyendo las posibilidades de erosión genética dentro de las poblaciones (Cavalcante, 1991; Storti, 1993; Raven *et al.*, 1996; Goulding, 1989; Hiraoka, 1999).

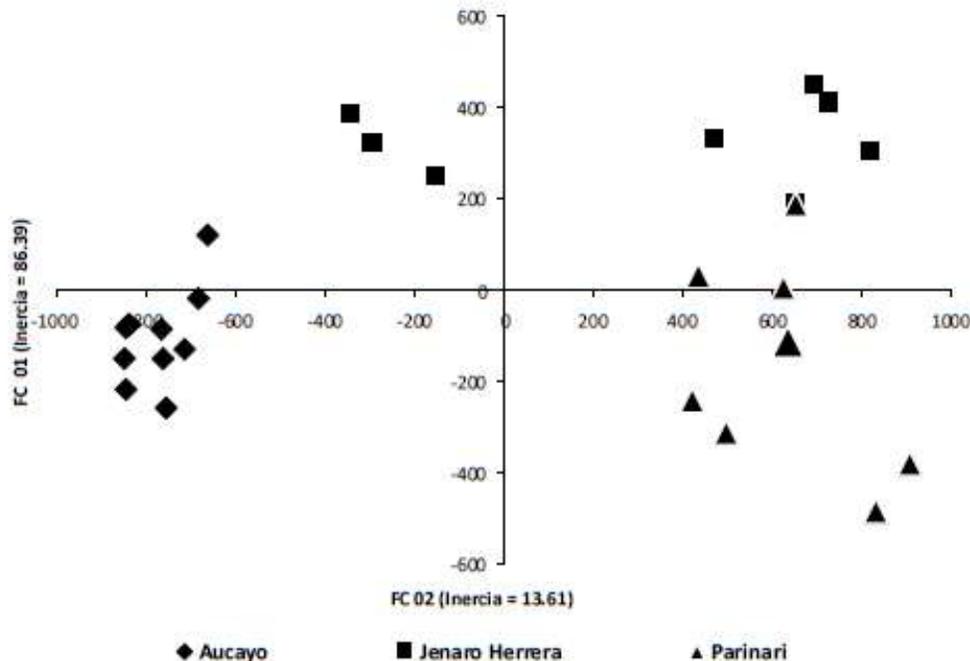


Figura 4. Representación gráfica de los resultados del Análisis Factorial de Correspondencia (AFC), inferidos en función a los genotipos encontrados para las tres poblaciones naturales de aguaje *Mauritia flexuosa* estudiadas en la Amazonia peruana. Los puntos están distribuidos sobre un plano factorial bidimensional.

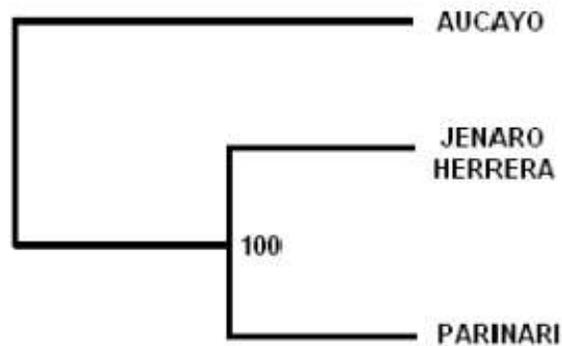


Figura 5. Dendrograma de similitud (UPGMA) generado con la distancia genética de Reynolds et al. (1983) para las tres poblaciones naturales de aguaje *Mauritia flexuosa* estudiadas en la Amazonia peruana. Los números en los nudos de las ramas representan valores de Bootstrap para 1000 repeticiones.

Tabla 3. Estimación de los índices de fijación (F_{st}), distancia genética y distancia geográfica entre las tres poblaciones naturales de aguaje *Mauritia flexuosa* estudiadas en la Amazonia peruana.

POBLACIONES	F_{st}	DISTANCIA GENÉTICA (Reynolds et al., 1983)	DISTANCIA GEOGRÁFICA (Km)
Aucayo - J. Herrera	0,48	0,6613***	131,49
Aucayo - Parinari	0,68	1,1343***	174,94
J. Herrera - Parinari	0,21	0,2343***	98,37

*** Significativa $P < 0.001$ (0.1%)

AGRADECIMIENTOS

Al Proyecto Innovación y Competitividad para el Agro Peruano – INCAGRO, por el financiamiento parcial del presente estudio a través del subproyecto “Mejoramiento genético, caracterización molecular, y tecnologías de alto valor agregado del aguaje (*Mauritia flexuosa* L.f.) en la Amazonia peruana”.

BIBLIOGRAFÍA CITADA

- Balick, M.J. 1979. Amazonian oil palms of promise: a survey. The New York. The Botanical Garden. *Economic Botany*, 33(1):11–28.
- Bejarano, P.; Piana, R. 2002. Plan de manejo de los aguajales aledaños al caño Parinari. Iquitos, Perú, 44pp.
- Belkhir, K.; Bursce, P.; Chichi, I.; Raufast, N.; Burhomme, F. 2004. Genetix 4.05.2. Logiciel sous windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire genome, populations, interactions, CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II, Montpellier, France.
- Cavalcante, P. 1991. Frutas comestíveis da Amazônia. Quinta edição. Belem: Museu Paraense Emilio Goeldi, Brasil. 279pp.
- De Paula, F.N.M. 2001. *Estratégias de produção de sementes estabelecimento de plântulas de Mauritia flexuosa L. f. (Arecaceae) no Vale do Acre, Brasil*. Tese de Doutorado, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/ Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas, Brasil. 203pp.
- Del Castillo, D.; Freitas, L.; Otárola, E. 2006. Aguaje, la maravillosa palmera de la Amazonia peruana. Wust Ediciones, Iquitos, Perú. 52pp.
- Delgado, C.; Couturier, G.; Mejía, K. 2007. *Mauritia flexuosa* L. f. (Arecaceae: Calamoideae), an Amazonian palm with cultivation purposes in Peru. *Fruits*, 62(3):1–12.
- Desmarais, E.; Laneluc, I.; Lagnel, J. 1998. Direct amplification of length polymorphisms (DALP) or how to get and characterize new genetic markers in many species. *Nucleic Acids Research*, 26(6):1458–65.
- Doyle, J.J.; Doyle, J.L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical*, 19:11–5.
- Felsenstein, J. 1993. Phylogeny Inference Package (PHYLIP). Version 3.5. University of Washington, Seattle. Washington, 132pp.
- Hiraoka, M. 1999. Miriti (*Mauritia flexuosa* L. f.) Palms and their uses and management among the ribeirinhos of the Amazon Estuary. In: Padoch, C.; Ayres J. M.; Pinedo-Vásquez, M.; Henderson, A. (ed). *Varzea, diversity, development, and conservation of amazonas with the water floodplains*. The New York Botanical Garden, 407pp.
- Inrena, 2000. Plan Maestro para la Conservación de la Diversidad Biológica y el Desarrollo Sostenible de la Reserva Nacional Pacaya Samiria y su Zona de Amortiguamiento. Ministerio de Agricultura. Loreto – Perú, 153pp.
- Kalliola, R. 1993. Amazonia Peruana, vegetación húmeda tropical en el llano subandino. Proyecto Amazonia, Universidad de Turku, Turku, Finlandia, 265pp.
- Page R.D.M. TreeView, 1996. 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.
- Pintaud, J.-C.; Couvreur, T.L.P.; Hahn, W.J.; De Granville, J.-J.; Pham, J.-L.; Ludeña B. 2007. Phylogenetic Relationships of the Cultivated Neotropical Palm *Bactris gasipaes* (Arecaceae) with its Wild Relatives Inferred from Chloroplast and Nuclear DNA Polymorphisms. *Systematic Botany*, 32(3):519–30.
- Pronaturaleza. 2005. Plan de Manejo Forestal *Mauritia flexuosa* L. f. “aguaje” Reserva Nacional Pacaya Samiria. Informe Técnico. Loreto, Perú. 52 pp.
- Raven, P.H.; Evert, R.F.; Eichhorn, S.E. 1996. *Biología vegetal*. Quinta edición. Guanabara Koogans, Rio de Janeiro, 728pp.
- Rengifo, D. 2008. *Marcadores RAPD ligados al sexo de Mauritia flexuosa L. f. aguaje (Arecaceae) en el distrito de San Juan Bautista*, Tesis de pre-grado, Universidad nacional de la Amazonia Peruana, Loreto, Perú. 78pp.
- Reynolds, J.; Weir, B.S.; Cockerham, C.C. 1983. Estimation of the coancestry coefficient: basis for a short-term genetic distance. *Genetics*, 105:767–79.
- Sambrook, J.; Russell, D. 1991. *Molecular Cloning: A laboratory Manual*, 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Storti, E. 1993. Biología floral de *Mauritia flexuosa* L. f. na regiao de Manaus, Amazonas, Brasil. *Acta amazónica*, 23(4): 371–81.
- Weir BS, Cockerham CC. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 38:1358–70.