

**UNIVERSIDAD NACIONAL “PEDRO RUÍZ GALLO”**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE BIOLOGÍA**

CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE LA VARIABILIDAD  
GENÉTICA DEL SAPOTE (*Capparis scabrida*) MEDIANTE AFLP DE SEIS  
DISTRITOS DE LA REGIÓN LAMBAYEQUE. OCTUBRE 2015- MARZO 2016.

**TESIS**

**Para Optar el Título Profesional de:**

**Licenciado en Biología**

**Autor**

RIVERA AYASTA, BETTY ALESSANDRA DEL MILAGRO.

**Patrocinador:** Dr. CÉSAR ESTELA CAMPOS.

**Co-Patrocinador:** PhD. RAÚL BLAS SEVILLANO.

**LAMBAYEQUE-PERÚ**

**2017**



**UNIVERSIDAD NACIONAL “PEDRO RUÍZ GALLO”**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE LA VARIABILIDAD  
GENÉTICA DEL SAPOTE (*Capparis scabrida*) MEDIANTE AFLP DE SEIS  
DISTRITOS DE LA REGIÓN LAMBAYEQUE. OCTUBRE 2015- MARZO 2016.

**TESIS**

**Para Optar el Título Profesional de:**

**Licenciado en Biología**

**Autor**

RIVERA AYASTA, BETTY ALESSANDRA DEL MILAGRO.

**Patrocinador:** Dr. CÉSAR ESTELA CAMPOS

**Co-Patrocinador:** PhD. RAÚL BLAS SEVILLANO

**LAMBAYEQUE-PERÚ**

**2017**

**UNIVERSIDAD NACIONAL PEDRO RUÍZ GALLO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE BIOLOGÍA**

**TESIS**

CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE LA VARIABILIDAD  
GENÉTICA DEL SAPOTE (*Capparis scabrida*) MEDIANTE AFLP DE SEIS  
DISTRITOS DE LA REGIÓN LAMBAYEQUE. OCTUBRE 2015- MARZO 2016.

BETTY ALESSANDRA DEL MILAGRO RIVERA AYASTA.

**Aprobado por:**

-----  
**PhD. PEDRO JORGE  
CHIMOY EFFIO  
PRESIDENTE DEL JURADO**

-----  
**Dra. CARMEN CALDERON ARIAS  
SECRETARIA**

-----  
**Dra. MARLENE CARDOZO  
QUINTEROS  
  
MIEMBRO VOCAL**

-----  
**Dr. CÉSAR ESTELA CAMPOS  
PATROCINADOR**

## DEDICATORIA

Para mis amados abuelos, Eusebio y Dominga.  
Para mis queridos tíos German y Rosa.  
Para mi estimado profesor Carlos.

## **AGRADECIMIENTO**

Dios mediante, agradezco a mis abuelos, la oportunidad brindada al decir sí a mi crianza sigue siendo una motivación en mi vida.

Mis padres, el pilar de mi formación, a mi mamá Bety, nunca me negó cosa alguna, he hizo y sigue haciendo un excelente trabajo de madre y educadora, admiro su temple y valentía por haber hecho siempre de ella y de mí una mejor persona, a mi papá Miguel quien me enseñó a ser fuerte ante cualquier adversidad.

Agradezco al Instituto de Biotecnología y Biología Molecular de la Universidad Nacional Agraria la Molina por el financiamiento. A mi co asesor, el PhD. Raúl Blas Sevillano por haberme dado la oportunidad de estar en su laboratorio, así como su apoyo científico incondicional en el desarrollo del proyecto.

A mi asesor César Estela Campos por la ayuda requerida desde el primer momento en ir a la universidad Nacional Agraria la Molina, hasta la culminación de mi tesis.

A las personas que me recibieron con las mejores ganas de apoyarme y compartir conocimiento, especialmente a Joel Flores, Yosselym, Isamar, César, Fisher e Inés.

A mi amiga Ruth por haberme apoyado en mi estadía por Lima.

Así mismo un agradecimiento especial al botánico Luis García, por haberme apoyado en el muestreo y haber compartido conocimiento sobre la diversidad nativa de la región. Así también en las duras caminatas, las conversaciones para poder aguantar el sol insaciable durante el muestreo y sobre todo haber compartido un grato momento de investigación.

A mis tías Julia, Margarita, Daddy, tíos, Carlos, Luis, Freddy, Luis y Franklin, a mi prima Mónica y mis primos Carlos Enrique, César y Dick, quienes siempre me brindaron su apoyo. Y a mis padrinos Dora y Javier por haber confiado siempre en mí, cada palabra y visita fue una motivación más para seguir haciendo investigación.

A mi hermana y mejor amiga Yerardine, con quien inicie mis primeros pasos en biología, cada peripecia y logró fue gracias al apoyo mutuo. A mis grandes amigos, Daniel, Juan Enrique, Arly, Ada, María, Seclen, Jhonson, Gilbert, son amigos con historias inspiradoras, llenas de esfuerzo y coraje, más aún en el mundo de la investigación, compartiendo siempre risas, tristezas y logros.

Dios siempre ha puesto grandes personas en mi vida, ellos saben quiénes son, a todos ellos, gracias.

## INDICE

INDICE .....	VI
ABREVIATURAS .....	XII
RESUMEN.....	XIII
ABSTRACT .....	XIV
I. INTRODUCCIÓN .....	1
II. ANTECEDENTES .....	4
III. MARCO TEORICO .....	7
3.1. PLANTAS FORESTALES .....	7
3.2. PRODUCTOS FORESTALES NO MADERABLES (PFNM).....	8
3.3. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DEL SAPOTE .....	9
3.4. FAMILIA CAPPARACEAE. ....	9
3.5. GÉNEROS Y ESPECIES RELACIONADOS .....	10
3.6. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA .....	10
3.7. DISTRIBUCIÓN DEL SAPOTE .....	11
3.8. USOS DEL SAPOTE.....	12
3.9. EL SAPOTE Y SUS PROBLEMAS DE CONSERVACIÓN.....	14
3.10. DEPARTAMENTO DE LAMBAYEQUE .....	15
3.11. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA.....	16
3.12. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR. ....	17
3.13. MARCADORES AFLPs.....	18
3.14. VARIABILIDAD GENÉTICA .....	19
IV. MATERIAL Y MÉTODOS.....	20
4.1. UBICACIÓN.....	20
4.2. MATERIAL .....	21
4.3. METODOLOGÍA. ....	23
4.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	33
V. RESULTADOS .....	36
5.1. RESULTADOS MORFOLÓGICOS.....	36
5.1.1. DESCRIPTORES MORFOLÓGICOS CUALITATIVOS .....	36

5.1.2. DENDOGRAMA DE CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA. ....	39
<b>5.2. ANÁLISIS MOLECULAR .....</b>	<b>42</b>
5.2.1. SELECCIÓN DE LOS INICIADORES AFLP .....	42
5.2.2. ÍNDICE DE CONTENIDO POLIMÓRFICO (PIC).....	<b>43</b>
5.2.3. DENDOGRAMA DE CARACTERIZACIÓN MOLECULAR.....	44
5.2.4. ANÁLISIS DE VARIANZA MOLECULAR (AMOVA) .....	45
 <b>VI. DISCUSIÓN.....</b>	 <b>47</b>
 <b>VII. CONCLUSIONES .....</b>	 <b>49</b>
 <b>VIII. RECOMENDACIONES.....</b>	 <b>50</b>
 <b>IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	 <b>51</b>
 <b>X. ANEXOS.....</b>	 <b>59</b>

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1 Señalización de distritos analizados, observados en un Mapa de la región Lambayeque.....	20
Figura 2 Electroforesis en gel de agarosa (1%), visualizando las bandas de DNA extraído de hojas de sapote ( <i>Capparis scabrida</i> ); y el marcador lambda (M), cuya primera banda mide 14800 pares de bases (Pb).....	27
Figura 3 Pasos de la técnica molecular AFLP.....	31
Figura 4 Visualización de bandas de DNA genómico mediante la técnica de electroforesis vertical en geles de poliacrilamida.....	33
Figura 5 Distribución de individuos de acuerdo a sus características morfológicas, teniendo en cuenta los descriptores para el primer carácter y sus estados.....	36
Figura 6 Distribución de individuos de acuerdo a sus características morfológicas, teniendo en cuenta los descriptores para el segundo carácter y sus estados .....	36
Figura 7 Distribución de individuos de acuerdo a sus características morfológicas, teniendo en cuenta los descriptores para el tercer carácter y sus estados .....	37
Figura 8 Distribución de individuos de acuerdo a sus características morfológicas, teniendo en cuenta los descriptores para el cuarto carácter y sus estados .....	37
Figura 9 Distribución de individuos de acuerdo a sus características morfológicas, teniendo en cuenta los descriptores para el quinto carácter y sus estados .....	38
Figura 10 Distribución de individuos de acuerdo a sus características morfológicas, teniendo en cuenta los descriptores para el sexto carácter y sus estados .....	38
Figura 11 Distribución de individuos de acuerdo a sus características morfológicas, teniendo en cuenta los descriptores para el séptimo carácter y sus estados .....	39



Figura 12 Dendograma obtenido mediante el programa Ntsys 2.20 de la caracterización morfológica, demostrando un análisis de agrupamiento.....	41
Figura 13 Dendograma obtenido mediante el programa Ntsys 2.20 del análisis molecular.....	45

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1 Concentración de cada uno de los reactivos utilizados en el proceso de digestión de DNA genómico .....	28
Cuadro 2 Concentración de cada uno de los reactivos utilizados en el proceso de ligación del DNA genómico.....	29
Cuadro 3 Concentración de cada uno de los reactivos utilizados en el proceso de Pre-amplificación del DNA genómico .....	29
Cuadro 4 Concentración de cada uno de los reactivos utilizados en el proceso de amplificación selectiva del DNA genómico .....	30
Cuadro 5 Iniciadores utilizados en la amplificación selectiva con sus respectivas secuencias.....	32
Cuadro 6 Individuos duplicados presentando los mismos valores para los descriptores analizados y sus estados. ....	42
Cuadro 7 Determinación del número de bandas monomórficas, polimórficas y sus respectivos porcentajes por cebador empleado.....	43
Cuadro 8 Determinación del cebador con el índice de contenido polimórfico más alto.....	43
Cuadro 9 Porcentaje de variación entre distritos a partir de un análisis de varianza molecular (AMOVA).....	46

## ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 1	ESPECIES FORESTALES EN LA FINCA CASA DE TABLA EN CUBA.....	59
ANEXO 2	INSTALACIONES DE PLANTACIONES FORESTALES AL AÑO 2011. ....	59
ANEXO 3	SUPERFICIE REFORESTADA ANUALMENTE, SEGÚN DEPARTAMENTO DESDE 1999 AL AÑO 2014.....	60
ANEXO 4	ASPECTOS DESTACADOS DE LAS COMUNIDADES ESTUDIADAS DE MÉXICO Y BOLIVIA Y LAS CADENAS DE VALOR DE LOS PRODUCTOS.....	60
Anexo 5	Planta de herbario de <i>Colicodendron scabridum</i> Seem ( <i>Capparis scabrida</i> KUNTH) .....	61
ANEXO 6	TIPOS DE DESCRIPTORES.....	62
ANEXO 7	LUGARES DE DISTRIBUCIÓN DEL SAPOTE .....	62
ANEXO 8	COORDENADAS DE CADA INDIVIDUO ANALIZADO .....	63
ANEXO 9	PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE ADN: MÉTODO CTAB DE DOYLE & DOYLE CON ALGUNAS MODIFICACIONES. ....	67
ANEXO 10	ANÁLISIS DE CALIDAD Y CUANTIFICACIÓN DE ADN .....	68
ANEXO 11	TAMIZADO CON 16 PRIMERS.....	69
ANEXO 12	PREPARACIÓN DE GELES DE POLIACRILAMIDA .....	70
ANEXO 13	TINCIÓN Y REVELADO DE LOS GELES DE POLIACRILAMIDA. ....	71
ANEXO 14	IMÁGENES DE LA VARIABILIDAD DE LOS INDIVIDUOS RESPECTO A LOS DESCRIPTORES. ....	72

## ABREVIATURAS

DNA: Deoxyribonucleic acid (Ácido desoxirribonucleico)  
AFLP: Amplified fragment length polymorphism  
AMOVA: Análisis de varianza molecular  
CTAB: Bromuro de N, N, N-trimetilhexadecanamonio  
DNTPS: Deoxinucleotidos trifosfato  
EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid (Ácido etilendiaminotetraacético)  
INRENA: Instituto Nacional de Recursos Naturales  
IUCN: Unión Internacional Para la Conservación de la Naturaleza  
IPGRI: Institute for Plant Genetic Resources  
MINAG: Ministerio de Agricultura  
MINAM: Ministerio del Ambiente  
MM: Marcador Molecular  
NTSYS: Numerical Taxonomy System  
PCR: Polimerase Chain Reaction  
PFNM: Producto forestal no maderable  
PIC: Polymorphic information coefficient  
RAPD: Random Amplified Polymorphic DNA  
SHBP: Santuario Histórico Bosques de Pomac  
SP: Selva Premontana  
TBE: Tris/Borate/EDTA  
TE: Tris/EDTA  
UPGMA: Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean

## RESUMEN

El sapote (*Capparis scabrida*), una especie forestal en peligro crítico, debido a su insostenible explotación. Se le encuentra desde Ecuador hasta Áncash en Perú. Utilizado ampliamente por su madera en artesanía y como leña, estas dos acciones son algunas de las causas de su degradación masiva, sin descartar la urbanización, la ganadería y agricultura, delimitando su extensión y ecosistema. En el presente trabajo se caracterizó morfológica y molecularmente a 81 individuos de sapote dentro de seis distritos de la región Lambayeque (Pítipo, Zaña, Nueva Arica, Salas, Olmos y Reque). Para la caracterización morfológica se determinaron siete descriptores en la Universidad Nacional Agraria la Molina, teniendo como referencia los datos para otras especies dadas por el IPGRI, en la caracterización molecular se emplearon cinco combinaciones de iniciadores para marcadores AFLP. El análisis de agrupamiento mostró, con un coeficiente de disimilitud de cero, 61 morfotipos diferentes y 20 morfotipos iguales. En el análisis molecular se realizó un agrupamiento y el AMOVA, demostrando ambos análisis la variabilidad entre individuos dentro de un mismo distrito. La conclusión de esta investigación demostró que la caracterización molecular y morfológica expresó variabilidad intraespecífica de los individuos de sapote dentro de un mismo distrito y un bajo porcentaje de variabilidad del sapote por distritos.

Palabras claves: sapote, peligro crítico, descriptores morfológicos, marcador molecular, variabilidad genética.

## Abstract

The sapote (*Capparis scabrida*), a forest species in critical danger, due to its unsustainable exploitation. It is found from Ecuador to Ancash in Peru. Widely used for its wood in crafts and firewood, these two actions are some of the causes of its massive degradation, without ruling out urbanization, livestock and agriculture, delimiting its extension and ecosystem. In the present work, 81 individuals of sapote were characterized morphologically and molecularly in six districts of the Lambayeque region (Pítipo, Zaña, Nueva Arica, Salas, Olmos and Reque). For the morphological characterization, seven descriptors were determined at the National Agrarian University of La Molina, using the data for other species given by the IPGRI, in the molecular characterization five combinations of primers were used for AFLP markers. The cluster analysis showed, with a dissimilarity coefficient of zero, 61 different morphotypes and 20 equal morphotypes. In the molecular analysis a clustering and the AMOVA were performed, both of which demonstrated the variability among individuals within the same district. The conclusion of this research showed that the molecular and morphological characterization expressed intraspecific variability of sapote individuals within the same district and a low percentage of sapote variability by districts.

**Keywords:** Sapote, critical danger, morphological descriptors, molecular marker, genetic variability

## I. INTRODUCCIÓN

El sapote es una especie forestal de bosque seco, se le puede encontrar en campo como árbol o arbusto; dentro de sus propiedades es resistir épocas de sequías, es una de las especies que se adapta a los climas secos y se regenera en eventos climáticos como el niño a pesar de tener estas y otras propiedades, es una especie que se encuentra en peligro crítico, debido a una sobreexplotación, esencialmente por el uso ejercido de los pobladores hacia su madera, como leña y materia prima en artesanía<sup>1</sup>.

Esta especie presenta una extensión por bosques secos, en Perú abarca desde Tumbes hasta Áncash, pero también abarca zonas de Ecuador desde Manabí hasta Loja, parte de su extensión es debido a sus polinizadores, como son los murciélagos, el zorro de sechura, el oso andino y algunas aves<sup>2</sup>.

No obstante el sapote no solo es considerado una especie forestal, también es considerado un producto forestal no maderable (PFNM) esto debido a que no se hace uso de su madera sino de otras partes de la planta, como es el fruto, y es muy consumido por los pobladores desde noviembre o diciembre hasta marzo o abril, incluso algunos animales lo consumen como el zorro de sechura<sup>1</sup> y el oso andino<sup>3</sup>. Del fruto también se ha obtenido una mermelada, como también su látex es empleado como goma, con propiedades parecidas al de la goma arábica, utilizada también en estudios industriales y tecnológicos<sup>4</sup>, está es otra alternativa conseguida para la población del sapote, así no sigue disminuyendo por la explotación de su madera<sup>1</sup>.

Se ha descrito esta especie a nivel taxonómico, fenológico, pero no se ha llevado a cabo un estudio sobre su variabilidad, si bien es cierto en la región de Lambayeque se cuenta con tres zonas para el cuidado de especies endémicas, como son los Bosques de Pomac, la Reserva Privada de Chaparrí y el Refugio de Vida Silvestre Laquipampa, no se sabe cuánto de variabilidad se encuentra en estas zonas y también en zonas aledañas, fuera de las reservas<sup>5</sup>.

Existe muy poca información acerca del sapote, pese a tener grandes cualidades y ser considerada una especie forestal en peligro crítico<sup>6</sup>; así a nivel forestal no se hacen reforestaciones con árboles propios de la zona, en la mayoría de departamentos del Perú se reforesta y hacen plantones forestales con el eucalipto, siendo solo algunos departamentos quienes utilizan especies propias de esas zonas<sup>7</sup>.

En Lambayeque se utiliza en gran medida el eucalipto para reforestar, pero al año 2014 no se han llevado a cabo ningún tipo de reforestación, Piura un departamento colindante a Lambayeque si reforesta en mayor cantidad con algarrobo una especie forestal propia del norte peruano y de bosque seco<sup>7</sup>.

No obstante la importancia dada es casi nula o ninguna, debido a la implicancia de aquellas especies forestales que cumplen un alto valor en el mercado por su madera, esto sin considerar que puede existir una alta variabilidad de especies forestales endémicas de vital importancia. La naturaleza ofrece un medio biótico y abiótico con los cuales conviven los individuos, cualquier cambio conlleva a una especie a adaptarse y a la vez adopte una nueva característica, la cual será heredada, teniendo así una nueva información genética; a pesar de que exista reproducción entre individuos de la misma especie, esto no deja pasar las diferencias que puede existir entre un individuo y otro, y a la suma de todas estas diferencias se le conoce como variabilidad genética de una especie, cuyas variantes le permiten a las especies adaptarse a los diferentes cambios climáticos<sup>8</sup>.

La variabilidad encontrada de una especie ya sea dentro o entre poblaciones merecen una atención importante. Es por ello que en este trabajo de investigación se planteó el objetivo general de realizar una caracterización morfológica y molecular de la variabilidad genética del sapote mediante AFLP de seis distritos de la región Lambayeque, cuyos objetivos específicos fueron determinar los descriptores morfológicos y sus porcentajes de variación, y el cebador más polimórfico.



El poder realizar hoy en día una investigación a nivel morfológico t molecular, conlleva un valor agregado, no sólo para el investigador, también para la especie estudiada, en este caso, el sapote es una especie que sólo se le ha dado una importancia taxonómica, incluyendo a otras Capparaceae, no obstante se desconoce mucho sobre esta especie; se determinó no solo un estudio de características morfológicas; también fue posible proponer los primeros descriptores morfológicos, así como su primer estudio molecular, esta investigación es la base para nuevos estudios y propuestas para la especie del sapote, estableciendo parámetros para una mayor investigación.

## II. ANTECEDENTES

En una región de África, Etiopía, se encontraba una superficie boscosa del 40% y pasados 100 años solo quedó un relicto del 3% de la superficie total de bosques, y esto debido no solo a la deforestación, también al uso de tierras para la agricultura y la colonización de las mismas. También por hacer cambios de suelo, el 8,4% de bosques densos fueron afectados y destruidos. Una de las grandes zonas boscosas en el mundo pertenece a la amazonia brasileña, la cual presenta problemas de deforestación, colonización por inmigrantes y emigrantes<sup>9</sup>.

En la finca Casa de Tabla en Cuba, se realizó un inventario forestal encontrándose un total de 22 especies, representando una superficie total de 1093,19 has., de las cuales pertenecen a bosques naturales (de galería) 398,18has (36,10%), áreas con vocación forestal (reductos de bosques aislados) 687,01 has (63,72%) y áreas cultivables (piña) de 2 has (0,19%). En la finca después de la realización del inventario forestal arrojó una superficie de 1076,19 has, 26 rodales de bosques naturales, representando una superficie promedio del rodal de 41,4 has.<sup>10</sup> (Anexo 1).

En Oxapampa destacan especies forestales de prioridad entre los pobladores, los árboles de ulcumano (*Nageia rospigliosi*), tornillo (*Cedrelinga catenaeformis*) y pacaes (*Inga spp*), también el nogal, anona de monte, capirona, bolaina, sangre de grado, pino chuncho, charapacho, topa y especies utilizadas para la silvicultura como el ulcumano, tornillo y pacaes<sup>11</sup>.

Las plantaciones forestales al año 2011 destacaron en los departamentos de la Libertad con 330,04 has, seguido de Cajamarca con 6.026,22 has, los departamentos que menos áreas deforestadas tienen son Tacna con 83,57 has y Moquegua con 70,45 has. Lambayeque destaca con 88,941 has forestadas. La superficie reforestada hasta el 2011 fue destacada en Cusco con 127.818,88 has, seguido de Cajamarca con 116.552,65 has, con menos áreas reforestadas están Tacna, Tumbes e Ica<sup>12</sup> (Anexo 2).

En Amazonas destaca la huabilla para madera aserrada, en Ancash el eucalipto para madera rolliza y aserrada, en Arequipa, Ayacucho, Apurímac, Lima, la libertad, Pasco, Puno, Tacna, destaca el eucalipto con mayor uso para madera. No obstante en otras regiones prevalecen especies propias de la zona como materia prima para obtener la madera, son los casos de Lambayeque con el faique, Loreto con la capirona, Madre de Dios con el shihuahuaco, san Martín con el tornillo, Huánuco con la bolaina blanca<sup>12</sup>.

Las especies maderables de priorización encontradas en los anexos de Puma hermana, Ocol y San José de la comunidad campesina Taulí Molipampa, en la provincia de Chachapoyas, en Amazonas, son el aliso (*Alnus acuminata*), cedro de altura (*Cedrela odorata*), chilca brava (*Gordonia fruticosa*), ishpingo amarillo o moena (*Ocotea sp*), san pablo (*Solanum pseudosycophanta*), de todas estas especies se venden como madera el 38%, 26% es utilizada en carpintería, el 22% en construcción y el restante 14% son utilizados en otras actividades<sup>13</sup>.

En México y Brasil se determinaron 10 productos forestales no maderables (PFNM) en zonas rurales, de las cuales la palma jipijapa y los hongos comestibles presentan un mayor impacto y auge. Los pobladores hacen un buen uso de estos productos, como la goma utilizada en Bolivia proveniente de la planta *Hevea brasiliensis*, producen bolsas de este material, y vemos una alternativa que no conocen los pobladores y aportan un bien a partir de recursos naturales. Otras especies presentan un aumento en su demanda, como también en otras ha bajado su comercialización, por elevarse la demanda en otros productos. Así mismo se destaca la comercialización de productos forestales no maderables (PFNM) a nivel local, son pocos los productos que son llevados a mercados regionales y más aún internacionales<sup>14</sup> (Anexo 03).

Se reportaron comunidades rurales, con varios niveles de pobreza para México y Brasil, donde se analizaron 289 hogares en total, de todos ellos sólo 46 son comerciantes de PFNM las cuales utilizan PFNM como sustento de vida acompañado de la agricultura, no obstante se presenta una falta de interés por otros mercados y más aún por el gobierno hacia estos productos, no hay un apoyo social

y económico para la población rural, la falta de inclusión a la mujer, el obtener una legalización adecuada de los rubros rurales de un mercado, teniendo en cuenta el conocimiento del poblador sobre la comercialización. Aun así los pobladores rurales tratan de sacar a flote sus productos hacia mercados locales o en algunos casos se realizan procesos de trueque; esto conlleva a un tipo de éxito relacionado con productos forestales no maderables (PFNM), en los cuales el éxito se relaciona con la necesidades de la gente, y para otros presenta conceptos que hace que este trabajo sea provechoso<sup>14</sup>.

En el estado de Pará en Brasil, en el mercado de Santarém, se reportaron 12 productos forestales no maderables, los cuales presentan aspectos de sostenibilidad basado en 2 contextos, el primero en relación al tipo de factores, asociado con lo ecológico, relacionado a su vez con la obtención del producto, lo que implica el trabajo social, con la recolección, transformación, calidad del producto, venta y bienestar social; el segundo contexto incluye la sostenibilidad interna o externa de los productos forestales no maderables (PFNM). Se identificaron 12 productos forestales no maderables, los cuales destacan en primer lugar los productos provenientes de partes vegetativas de los arboles con un 67% y en segundo lugar, fragmentos de corteza con un 42%. La descripción morfológica arroja a arboles grandes de más de 10m de altura, pertenecientes a bosques naturales de tierras firmes. Se logró identificar 5 especies de las cuales provenían muchos de estos productos, las especies de Cumani (*Dipteryx odorata*), pau-d'arco (*Hanchoanthus impetiginosus*), andiroba (*Carapa spp*) y jatobá (*Hymenacea courbaril*) son utilizadas en la zona como componentes arbóreas de sistemas agroforestales<sup>15</sup>.

Es muy poca la investigación genética que ha sido conducida en árboles agroforestales en los trópicos, aun así se realizó un análisis molecular, usando la técnica de AFLP para *Calycophyllum spruceanum*, encontrándose diferencias genéticas entre poblaciones y un variación genética del 90,6% <sup>16</sup>.

### III. MARCO TEORICO

#### 3.1. Plantas forestales

La explotación de los bosques llevada a cabo por una deforestación no finaliza en su extinción, siempre y cuando se establezcan normas para establecer la continuidad de los bosques; no obstante cuando se realiza lo contrario llega la pérdida de especies forestales y ecosistemas coexistentes. Existen muchas zonas de Europa, América del norte y Australia con una reducida superficie forestal, debido a una errónea explotación de los recursos forestales; es de importancia también detener la deforestación elevada en América latina, Asia y África<sup>9</sup>.

Según la Dirección Nacional Forestal del Ministerio de Agricultura en Cuba, los ecosistemas boscosos forestales se relacionan directa o indirectamente con ramas sociales, culturales y económicas, es por ello la influencia y apoyo del gobierno, aún en periodos económicos inestables con la finalidad de fomentar el cuidado de los bosques. Esto es de importancia debido al aumento de la población, lo que demanda un mayor uso de los productos forestales, repercutiendo en una sobreexplotación, y pérdida de hábitat de otras especies<sup>10</sup>

En argentina destaca una especie de árbol forestal, el *Pinus elliottii*, var. *Elliottii* (Engelm), encontrada en zonas cálidas subtropicales y tropicales, y una alternativa a su uso maderero, celulósico, papeler, es la obtención de resina, considerándose una actividad muy productiva y alternante al ser la madera, el mayor producto utilizado<sup>17</sup>.

Una de las especies forestales comunes en Argentina es el eucalipto, las condiciones climáticas y edáficas de la superficie forestal ha permitido el desarrollo de la especie *Eucalyptus grandis*, ya sea por sus semillas o clones, el producto principal extraído de todo medio forestal es la madera y en este caso su mayor utilización es en el aserrado. La superficie forestal no siempre presenta excelentes condiciones climáticas o edáficas y es precisamente en ese contexto donde sobresalen otras especies mejor adaptadas como *E. camaldulensis*, *E. tereticornis*, *E. dunnii* o *E. benthamii*, las cuales pueden ser mejor aprovechadas por su

adaptabilidad, no obstante la calidad de su madera es menor; a partir de lo cual se pueden obtener híbridos interespecíficos con *E. grandis*, así se lograría una mayor extensión de especies forestales resistentes a variantes del clima y suelo y la obtención de madera de buena calidad<sup>18</sup>.

En Perú existe la Política Nacional del Ambiente<sup>13</sup>, la cual aborda la prevención de bosques y sus recursos por acciones que dañen estos ecosistemas como la deforestación, quema, negocios ilegales así como los usos alternantes de estas tierras para agricultura y ganadería; también prevalece los usos de los recursos forestales y no forestales, fauna silvestre y servicios ambientales con un manejo que no dañe estos ecosistemas. Se cuenta también con la Política Nacional Forestal y de Fauna Silvestre<sup>14</sup>, la cual protege el crecimiento del país con un integrado manejo de la conservación de biodiversidad, teniendo así un ecosistema que provee de bienestar a toda la población peruana a nivel sociocultural, económico y ambiental<sup>19</sup>.

El Perú cuenta con especies forestales, y los departamentos que presentan vastas zonas de biodiversidad forestal como bosques naturales o tropicales son Ucayali y Loreto, existe una relación de la madera con los pobladores, esta relación es la venta de madera para la subsistencia de la población, no obstante presentan tasas de pobreza extrema en un 40% al igual que un declive en el cuidado y conducción de especies forestales en ambientes naturales. El mayor déficit de los bosques peruanos es la deforestación, el Instituto de Recursos Naturales (INRENA) estableció 261.158 has al año 2014 deforestadas. San Martín es el departamento que ha sido más afectado por la deforestación, presenta un 23% de área deforestada del total nacional al año 2000, relacionándose con una pobreza del 60,5% en este departamento, esto debido a la estrecha relación de la venta o productividad de madera a partir de especies forestales como sustento de vida de comunidades pertenecientes a la selva<sup>20</sup>.

### **3.2. Productos forestales no maderables (PFNM)**

Los ecosistemas forestales incluyen como único y principal producto a la madera, pero existen productos forestales no maderables (PFNM), dentro de los cuales se utilizan diferentes partes de la planta excepto la madera<sup>14</sup>.

Los productos forestales no maderables en el Perú varían de acuerdo al departamento y a las especies con sus productos propios de una zona, así en Amazonas, Ayacucho, Ancash, Ica, Cajamarca, Huánuco, Lambayeque, la Libertad el producto más utilizado es la tara en vaina, sin embargo en Apurímac se utiliza el carrizo al igual en Cusco, en Huancavelica la tara en polvo, en Junín la chanca piedra, en Lima la caña brava, en Loreto, sangre de grado, específicamente el látex, en Madre de Dios la castaña, en Piura la algarroba, en Puno la tola, en San Martín el bambú, y en Ucayali la corteza de la uña de gato<sup>12</sup>.

### 3.3. Clasificación taxonómica del sapote

La siguiente clasificación es según la página online de Trópicos:

Clase: Equisetopsida C. Agardh

Subclase: Magnoliidae Novák ex Takht.

Superorden: Rosanae Takht.

Orden: Brassicales Bromhead

Familia: Capparaceae Juss.

Género: *Capparis*

Especie: *C. scabrida* Kunth<sup>21</sup>

\*Ver Anexo 4

### 3.4. Familia Capparaceae.

La familia Capparaceae consta de 29 géneros, con 700 especies en el mundo, 2 géneros y 3 especies en el valle de Tehuacan-Cuicatlan. Los géneros corresponden a *Capparis* y *Forchhammeria*; así como 2 especies de *Capparis*, *C. incana* y *C. pringlei*. Su distribución es a nivel mundial con un elevado número en las zonas secas de los trópicos y subtrópicos, existiendo pocas especies en climas mediterráneos<sup>22</sup>.

La familia Capparaceae se distingue por presentar flores simples a trifoliadas, hojas alternas, actinomorfas a ligeramente zigomorfas, numerosos estambres, ovario súpero con ginóforo, fruto abayado o capsular, el número de semillas varía, cocleadas o reniformes. En el distrito de Cajamarca, en Santa Cruz se encuentran especies como el zapote (*Capparis angulata*), *Cleome chilensis*, *Cleome glandulosa*<sup>23</sup>.

### 3.5. Géneros y especies relacionados

Existen especies de *Colicodendron* en zonas tropicales, las especies más comunes son *C. Bahianum* de Brasil, *C. valerabellum* de Venezuela, y *C. yco* Mart<sup>24</sup>.

La especie de *Capparis spinosa*, es uno de los más comerciales ya sea por sus botones florales, los frutos y ocasionalmente por sus brotes. También *C. silicua* Veill, *C. orientalis* Veill y *C. aegyptium* Lam, se les ha utilizado como condimento en la región del mediterráneo y los países vecinos desde tiempos antiguos<sup>25</sup>.

Se determinó un nuevo género segregado de *Capparis*, *Hispaniolanthus*, un género dentro de la familia Capparaceae encontrado en el bosque seco del occidente de Haití<sup>26</sup>.

En el Perú se ha encontrado la especie *Capparis sprucei* Eichler, es un arbusto conocido solamente en la cuenca del Huallaga en donde fue originalmente registrada en 1855 y luego a fines del siglo XX. Poco se sabe de las condiciones de sus poblaciones<sup>27</sup>.

### 3.6. Descripción botánica

El sapote es una Capparaceae que se caracteriza por ser arbusto con muchas ramificaciones y también se le encuentra como árbol, el daño en el tallo produce una goma característica de color marrón rojizo, las hojas son lanceoladas a oblongas, agudas a redondeadas. Apiculadas en el ápice, cuneada a redondeada, a veces retusa en la base, de color verde oliva, pero al secado presenta un brillante amarillo azufre en el material de herbario, hojas finamente estrelladas, tomentosas cuando son jóvenes. Flores de color marrón oscuro o color marrón verdoso, con numerosos estambres, de color blanco, ginóforo cremoso con vencimiento a púrpura. Inflorescencia terminal simple, rara vez es una flor solitaria axilar, consta también de 4 sépalos libres, distintos, cuatro pétalos imbricados. Fruto pseudoamfisarco, ovoide o elipsoide, ligeramente asimétrico colgante. La floración se realiza entre febrero a octubre y la fructificación de septiembre a diciembre. La polinización en su mayoría es llevada a cabo por murciélagos, pero también las flores son polinizadas en un



menor grado por abejas domesticas (*Apis mellifera* L.), colibrí (*Amazilia amazilia*) así como por avispas, coleopteros y varias especies de hormigas<sup>24</sup>.

Árbol de 25 a 51 cm de diámetro y 6 a 10 m de alto, con fuste cilíndrico e irregular. Corteza externa fisurada de color marrón oscuro. Ramitas terminales cilíndricas y densamente pubescentes. Hojas simples, alternas, 15 – 20 cm de largo, 2 a 4 cm de ancho, ápice y base obtusa, borde entero o sinuado; hojas glabrescentes por el haz y densamente pubescentes por el envés. Inflorescencias en racimos agrupados; presentan una floración no uniforme. Flores de color amarillo verdoso, hermafroditas; con 5 pétalos y estambres muy numerosos. Frutos de color verde parduzco, en forma de baya u ovoide, 5-10 cm largo, 4-8 cm de diámetro, con superficie cérea y textura áspera por la presencia de abundantes pilosidades estrelladas<sup>1</sup>.

### **3.7. Distribución del Sapote**

El sapote es una especie que se distribuye en el Norte del Perú y Sur del Ecuador entre los 0 y 2,500 m de altitud. Ha sido conocida desde los antiguos peruanos, quienes la utilizaron en sus actividades diarias, principalmente la madera empleada para la confección de diversos objetos (ídolos y utensilios), como leña, y los frutos en alimentación<sup>2</sup>.

El MINAM tiene dentro de sus funciones establecer ecosistemas en todo el Perú, así se elaboró el mapa del patrimonio forestal nacional, utilizando imágenes satelitales, a partir de esta información se pueden establecer mapas de bofedales, aguajales, bosques relictos, bosques secos, pajonales altoandinos, entre otros. Destacando los bosques secos, distribuidos en la región nor-oeste del país y en algunos valles interandinos. La composición florística de los bosques secos se diversifica a medida que asciende desde el nivel del mar. Así en las planicies encontramos entre sapotales a árboles de algarrobos y margaritos<sup>28</sup>.

Los bosques secos tipo sabana se encuentran ubicados en las planicies cubiertas por depósitos eólicos, de los departamentos de Lambayeque, Piura y Tumbes, comprendido desde cerca al nivel del mar hasta aproximadamente los 500 msnm, se extiende en una superficie de 1,307,716 has las cuales representan el 1,1 % del total

nacional. Este bosque está conformado por árboles dispersos de porte bajo, y copa aparasolada, dominado por las especies de algarrobo (*Prosopis* sp) y el sapote y en menor cantidad faique<sup>29</sup>.

Se considera al sapote dentro del bosque de *Prosopis-Capparis*, con 30 arb/ha, este alcanzaba el 6,16% del total del área de estudio y se caracterizaba por no presentar dominancia absoluta de ninguna especie. También está el bosque de *Capparis*, con 98 arb/ha y el sapote como especie dominante (85%) cabe señalar que el algarrobo no supera el 30%. Después se realizó una actualización forestal (2007), siendo el sapote ubicado en el bosque seco semidenso junto con *Prosopis pallida* y *Capparis avicennifolia*<sup>5</sup>.

Los bosques secos presentan zonas de recuperación debido a su alta degradación, y estas zonas están determinadas por *Prosopis* y *Prosopis-Capparis*, este último predomina sobre *Prosopis*, así mismo *Capparis angulata* (el vichayo) como el canutillo (*Grabowskia boerhaaviaefolia*) favorecen la fauna de la zona recuperada<sup>30</sup>.

### **3.8. Usos del Sapote.**

Los antiguos peruanos llevaban a cabo una serie de actividades y han utilizado a la biodiversidad como fuente de alimentos, o también para construcciones, así como rituales, entre otros. En el norte peruano destacan varias culturas, una de ellas es la cultura mochica ubicada en los valles Moche, estos últimos destacan por las huacas encontradas; una disciplina para evaluar ciertas actividades como los materiales utilizados para realizarlas por dichos pobladores, es la antracología, la cual estudia los carbones en contextos arqueológicos y explica la cultura paleo-ambiental, esto es determinado por un elemento químico, el 7/77, el cual caracteriza a los carbones de la Huaca la Luna y plataforma Uhle, en donde se encontraron 17 capas, siendo la última la más antigua, esto indicó, a las capas 3 y 10 caracterizadas por haber utilizado cañas, algarrobos, especies de Fabaceae, y a veces sauces y zapotes. Las capas 16 y 17 casi exclusivas de cañas y también algarrobos y lloque. Estas especies pudieron constituir materia prima de alimento, como también a nivel de construcciones o en rituales<sup>31</sup>.

Las especies cultivadas que son utilizados para comercialización interna o externa necesitan de ciertos cuidados, uno de ellos y quizá el más importante es la calidad de la especie a comercializar. La carambola (*Averrhoa carambola* L.) es una fruta que viene siendo puesta en el mercado con grandes ingresos capitales, no obstante una problemática que surge es la duración de esta fruta en el proceso de transporte, ya que son dañadas generalmente por bacterias; no obstante existe en la naturaleza constituyentes que son aprovechables para evitar la contaminación de estas frutas, como es la goma del zapote, su exudado presenta propiedades antibacterianas y permite a la fruta conservarse por más tiempo, a la vez de que es una alternativa natural y que no genera residuos tóxicos<sup>4</sup>.

Las plantas presentan diversas propiedades que son utilizadas de manera directa e indirecta, la industria farmacéutica trata de acoplar estas propiedades a los medicamentos. Una disciplina científica encargada de encontrar y analizar metabolitos secundarios es la fitoquímica. En el norte peruano existe una especie conocida comúnmente como vichayo, cuyo nombre científico es *Capparis ovalifolia*, esta especie se ha caracterizado por presentar esteroides, triterpenoides, taninos y flavonoides, dentro de los triterpenoides destaca el lupeol, compuesto químico solo encontrado para *Capparis spinosa*, caracterizado por sus propiedades antioxidantes. El aceite de las hojas del vichayo hacen frente a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, demostrando una propiedad medicinal<sup>32</sup>.

El oso andino es una especie registrada en varios ecosistemas; para evaluar sus puntos de hábitats se evalúan diversos aspectos, como restos alimenticios, heces, arboles trepados con signos de alimentación, raíces y troncos escarbados, basado en estos aspectos, se observaron a las bromeliaceas como la familia más consumida por el oso andino, no obstante se encontró en la Reserva de Chaparrí a la especie del sapote en restos alimenticios en heces. Así mismo lo más consumido por el oso andino es el fruto, seguido de la base foliar y en último lugar las raicillas de la diversas plantas<sup>3</sup>.

### 3.9. El Sapote y sus problemas de conservación.

El Instituto Nacional de Recursos Naturales (INRENA) establece zonas de vegetación, Sin embargo los diversos cambios ambientales permiten observar las diferencias a favor y en contra de la naturaleza, y como consecuencia el impacto en poblaciones adyacentes. Evaluar un ambiente, puede resultar muy costoso, no obstante, hay una manera fácil y de poco costo, es el uso de los satélites que orbitan la tierra para registrar los cambios de cobertura vegetal, así se determina que hubo cambios en relación a los años 86-94 hasta los años 99-01, esto demostró un retroceso de un 23, 1% en los bosques secos, se demostró un 38, 2% sin variación o destrucción vegetal. Existen especies que están en peligro crítico que se encuentran dentro de las zonas de explotación sin responsabilidad, como es el caso del sapote, y otras especies, debido a esto los estudios de cobertura vegetal mediante satélites es un estudio básico para poder saber cuánto están siendo deforestadas las especies vegetales<sup>33</sup>.

El cortarrama peruano (*Phytotoma Raimondii*) es una especie endémica del peru, distribuida desde Tumbes hasta Ancash. Los hábitats de esta especie son relativamente muchos, sin embargo la mayoría de los árboles donde estas aves viven, vienen siendo explotados por su madera, o por la deforestación de estas áreas arbóreas para cultivos, afectando seriamente especies de las cuales se alimenta y convive el cortarrama peruano, como son el algarrobo, sapote, satuyo, vichayo, solo son algunas de las especies de la cual subsiste esta ave, siendo el algarrobo y el canutillo, las especies más importantes en su alimentación y hábitat<sup>34</sup>.

Las migraciones de pobladores se deben a varios factores, sin embargo los nuevos lugares habitados por esta población puede ser en muchos casos el no indicado, eso se demostró en la invasión ocurrida en el santuario histórico bosque de Pomac (SHBP), en donde la mayoría eran pobladores de la sierra, y empezaron a invadir zonas arqueológicas y protegidas por presentar especies de flora y fauna, algunas endémicas, dando como resultado zonas deforestadas para la construcción de casas y cultivos, sin importarles las especies que habitaban en esta zona como el algarrobo, zapote, aves. Estas zonas naturales fueron degradadas por una invasión,

sin embargo se vienen recuperando y hay remanentes de bosques evaluados para reconstituir su hábitat<sup>35</sup>.

### **3.10. Departamento de Lambayeque**

La región de Lambayeque se caracteriza por tener influencia de culturas como la Cultura Gallinazo, Moche, Cultura Lambayeque, Chimú e Inca. Delimitada por los ríos Olmos, Motupe, La Leche, Chancay, Zaña, Cascajal, Riachuelo, San Cristóbal. Se encuentran zonas costeras que van desde los 4 msnm hasta la sierra con 3078 msnm. Lambayeque presenta 3 provincias, Lambayeque, Chiclayo y Ferreñafe<sup>36</sup>.

La región Lambayeque se ubica en la costa norte del Perú, teniendo algunas áreas andinas al noroeste de su territorio. Presenta una superficie de 14.231,30 Km<sup>2</sup>. Su relieve es poco accidentado, relativamente llano, con pequeñas lomas y planicies elevadas llamadas pampas, formadas y más provenientes en la zona andina. Presenta 4 valles, La Leche, Chancay, Reque, Lambayeque y Zaña. En la costa el clima es templado y húmedo, desértico, con escasas precipitaciones, salvo en los años que se produce el fenómeno del niño. La altitud va desde los 4 msnm (Pimentel) y 3078 msnm (Incahuasi) <sup>37</sup>.

La mayor parte del territorio lambayecano presenta vastas áreas desérticas y tablazos vecinos al mar, la sierra de Lambayeque comprende los flancos occidentales de la cordillera de los andes, de topografía muy accidentada con algunos valles interandinos entre los 2000 y 3000 msnm, y por último la selva, corresponde a una pequeña zona en la cuenca del río Huancabamba, en el distrito de Cañaris. Lambayeque presenta una mayor extensión de tierras que corresponden a la región costa y solo una pequeña parte a la sierra. El clima es semitropical, con alta humedad atmosférica y escasas precipitaciones en la costa sur <sup>38</sup>.

Lambayeque comparte con Piura el desierto de Sechura, conformando la superficie más extensa de tierras áridas del Perú. La pampa de olmos se ubica al norte del departamento de la provincia de Lambayeque y abarca más de la mitad del área total del departamento. Clima de tipo desértico subtropical, templado durante las estaciones de primavera, otoño e invierno y caluroso en época de verano. Los

vientos soplan del mar a la costa entre 9 de la mañana y 8 de la noche, formando oleajes, dunas y médanos<sup>39</sup>.

Ferreñafe se encuentra ubicado en la zona costera, por el flanco oriental del departamento atraviesa de norte a sur la cordillera de los andes, donde presenta zonas de más baja altitud y donde los andes se inclinan marcadamente al territorio costero. La continuidad del desierto se ve alterada por la presencia de las estribaciones de la cordillera que dan al territorio una ligera inclinación de este a oeste, es decir desde la cordillera en dirección al mar, y por la presencia de los lechos de ríos y valles, formados en los conos de deyección o contrafuertes de la cordillera occidental de los andes<sup>39</sup>.

### **3.11. Caracterización morfológica.**

La caracterización en plantas es considerada como la determinación del conjunto de características para diferenciarlas taxonómicamente<sup>40</sup>. En la caracterización de una especie se estima la variabilidad existente en el genoma de la población de individuos que la conforman. El objetivo principal es medir la variabilidad genética de una colección mediante el uso de descriptores definidos. Otros objetivos son el establecimiento de la representatividad de la colección, la investigación de la estructura genética a través de la determinación de poblaciones identificables, la identificación de duplicados dentro de una colección y la identificación de genes especiales o alelos particulares<sup>8</sup>.

Existen tipos de descriptores, los más utilizados son los de pasaporte, de manejo, del sitio y el medio ambiente, de caracterización y de evaluación. Así mismo un descriptor presenta estados y tipos de datos, esto se debe a que no todas las especies presentan una característica con la misma intensidad, estableciéndose escalas de valor para ese descriptor, los estados o categorías se adaptan a nivel cualitativo y cuantitativo. A nivel cualitativo se generan datos binarios, siempre y cuando la característica solo requiera dos estados, sin embargo puede haber descriptores con más de dos estados, dependiendo de la característica a analizar,

datos con secuencias ordinales y nominales, también se cuenta con descriptores cuantitativos, los cuales pueden ser discontinuos y continuos<sup>8</sup>(Anexo 5).

Existe variabilidad fenotípica y genotípica, aquellas características observables son consideradas fenotípicas y se evalúan basados en descriptores morfológicos, estos pueden ser botánicos taxonómicos los cuales presentan características morfológicas comunes a todos los individuos que constituyen una especie; luego están los descriptores morfoagronómicos, relacionándose en mayor proporción con especies cultivadas, pueden ser cualitativos o cuantitativos, considerando también algunos caracteres botánicos-taxonómicos, se les considera para el rubro agronómico, mejoramiento genético, producción y comercialización, a pesar de presentar alta heredabilidad suelen ser afectados por los factores ambientales llegando a presentarse cambios en los individuos; y por último los descriptores evaluativos, generando cambios influenciados por factores bióticos y abióticos<sup>8</sup>.

### **3.12. Caracterización molecular.**

Los tipos de marcadores y sus posibilidades de uso cambian continuamente. Un marcador es una secuencia de DNA, una molécula identificable o incluso una característica morfológica que puede ser asociada con un locus en particular. Los marcadores útiles son altamente polimórficos. Los loci monomórfico no proveen información de la estructura genética de la población<sup>9</sup>.

Un marcador molecular monomórfico es invariable en todos los organismos estudiados, pero cuando un marcador presenta diferencias en el peso molecular, actividad enzimática, estructura o sitios de restricción se dice que es polimórfico. A veces el grado de variación es tal que se denominan hipervariables<sup>41</sup>.

Para la caracterización de variedades, en los últimos años se ha utilizado diferentes tipos de marcadores morfológicos, bioquímicos y moleculares. Los marcadores más utilizados para la caracterización de plantas son los bioquímicos y los marcadores basados en ácido desoxirribonucleico (ADN), entre los que se pueden citar: Polimorfismo de Longitud de Fragmentos de Restricción (RFLP, del inglés: restriction Fragment length polymorphism), Amplificación Aleatoria del ADN Polimórfico (RAPD,

del inglés: Random Amplification of Polymorphic DNA), Polimorfismo de Longitud de Fragmentos Amplificados, (AFLP, del inglés: Amplified Fragment Length Polymorphic) y Microsatélites o Secuencias Simples Repetidas (SSR, del inglés: Short Sequence Repeat)<sup>42</sup>.

Estos marcadores moleculares son fenotípicamente neutros, presentan mayor segregación o polimorfismo que los morfológicos, pueden ser evaluados desde los primeros estados de desarrollo de las plántulas, son aplicables a cualquier tipo de material vegetal, son independientes de la época del año en que se realiza el análisis, permiten la identificación correcta de la variedad sin necesidad de muchos caracteres y están libres de los efectos epistáticos<sup>42</sup>.

### **3.13. Marcadores AFLPs**

La técnica molecular descrita por Vos et al.<sup>43</sup> denominada AFLP (polimorfismos en la longitud de los fragmentos amplificados) se considera una de las más rápidas y de menor costo. Esta técnica se basa en la amplificación selectiva de fragmentos de restricción digeridos a partir del DNA genómico total utilizando la PCR (Polymerase Chain Reaction). Los AFLPs pueden producir patrones de complejidad variada de acuerdo al tipo de enzimas de restricción y la longitud de los iniciadores usados en la PCR. De acuerdo con Paran et al.<sup>44</sup> los AFLP son marcadores que segregan de forma mendeliana, igual que los RFLP. Sin embargo, los RFLP no logran detectar la cantidad de loci polimórficos que se pueden encontrar mediante la técnica de AFLP.

El método de AFLP ha sido una herramienta útil para diferentes aplicaciones en las que no se conoce la secuencia nucleotídica por ejemplo el mapeo de la variabilidad genética, la migración de especies, y análisis filo y bio geográficos<sup>45</sup>.

Esta técnica de AFLP puede ser aplicada en las siguientes situaciones: a) cuando no existe información a priori de la secuencia, b) para estudios a nivel intra-específico, c) cuando la variabilidad genética es baja, d) para la rápida generación de datos, e) cuando se dispone de alta calidad de DNA y f) cuando no se han establecidos marcadores adecuados<sup>45</sup>.



### **3.14. Variabilidad genética**

La naturaleza ofrece un medio biótico y abiótico con los cuales conviven los individuos, es así que cualquier cambio hace que una especie se adapte y adopte una nueva característica la cual será heredada, teniendo así una nueva información genética, a pesar de que exista reproducción entre individuos de la misma especie, esto no deja pasar las diferencias que puede existir entre un individuo y otro, y a la suma de todas estas diferencias se le conoce como variabilidad genética de una especie, cuyas variantes le permiten a las especies adaptarse a los diferentes cambios climáticos<sup>8</sup>.

La variabilidad se genera a partir de varias fuentes como son, la evolutiva, geográfica, y también por medio de la domesticación. La variabilidad evolutiva se asocia con los procesos de especiación, la geográfica relacionada con la extensión de especies cultivadas y su dispersión natural y artificial, generando cambios adaptativos genéticos como respuesta al cambio de su nicho ecológico, concluyendo que a mayor dispersión geográfica, mayor variabilidad, y por último la domesticación, llevada a cabo por el hombre, teniendo como finalidad la obtención de características deseables<sup>8</sup>.

La variabilidad se encuentra en el genoma, es a partir del cual se generan características observables o aquellas que solo están a nivel genómico. Así tenemos las características observables o fenotípicas y las que no se expresan o genotípicas, sin embargo las características a nivel de genoma vienen siendo analizadas con técnicas moleculares, las cuales van alcanzando un mayor auge en la investigación<sup>8</sup>.

Los enfoques que se han utilizado para entender la variación genética en especies mexicanas incluyen isoenzimas, polimorfismos de fragmentos de restricción (RFLP, por sus siglas en inglés), polimorfismo de DNA amplificados aleatoriamente en mayor o menor grado (RAPD Y AFLP, por sus siglas en inglés), repetidas secuencias internas (ISSR, por sus siglas en inglés), microsatélites y secuencias de ADN<sup>46</sup>.

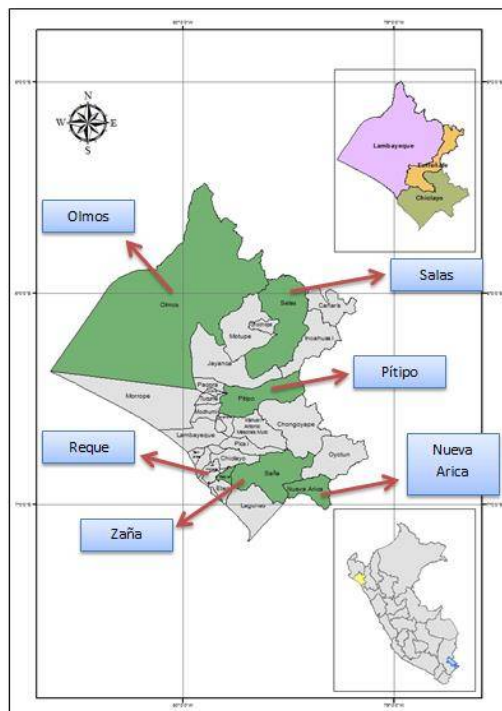
Existen factores ambientales que influyen en la variación de especies, uno de ellos es la altitud, debido a esto se pueden encontrar varias características para una misma especie, concluyendo una variación fenotípica<sup>47</sup>.

#### IV. MATERIAL Y MÉTODOS.

##### 4.1. Ubicación.

La investigación constó de 2 etapas, la primera etapa fue la recolección en campo de muestras de sapote en base a las características establecidas de descriptores morfológicos, recolección de datos y su posterior caracterización morfológica, de seis distritos de la región Lambayeque. Pítipo perteneciente a la provincia de Ferreñafe, Zaña, Nueva Arica y Reque se encuentran en la provincia de Chiclayo, Salas y Olmos en la provincia de Lambayeque (Figura 1).

La segunda etapa consistió en la caracterización molecular de las mismas plantas, la cual fue realizada en el Laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Biotecnología Y Biología Molecular de la Universidad Nacional Agraria la Molina (IBT-UNALM), ubicada a una latitud de 12°04'47'', longitud de 76°56'41'', y a una altitud de 243 m.s.n.m.



**Figura 1 Señalización de distritos analizados, observados en un Mapa de la región Lambayeque.**

## **4.2. Material**

### **4.2.1. Población**

La población estudiada fueron individuos de la planta del sapote (*Capparis scabrida*), recolectados de seis distritos de la región Lambayeque, esta población pertenece a bosques secos de Lambayeque, son individuos forestales en peligro crítico, por ello se evaluaron para presentar una base científica de su estudio.

### **4.2.2. Muestra**

La muestra representativa fueron 81 individuos escogidos de los seis distritos analizados.

### **4.2.3. Unidad de análisis**

Cada individuo de la especie (*Capparis scabrida*), en la dos etapas de la investigación, para la primera etapa se evaluaron sus características morfológicas y en la segunda etapa se utilizaron hojas de cada individuo para su extracción de DNA.

### **4.2.4. Material vegetal**

Se utilizaron 81 individuos de Sapote de la región Lambayeque. Los individuos fueron colectados dentro de seis distritos en el siguiente orden: Pítipa (18 individuos), Salas (6 individuos), Nueva Arica (16 individuos), Zaña (10 individuos), Olmos (17 individuos) y Reque (14 individuos). Esto tomado como referencia a lo citado por Llatas<sup>5</sup>, haciendo referencia a la localización de sapotes en 6 distritos de la región Lambayeque, así mismo se cambió el distrito de Motupe por el de Reque, debido a un muestreo previo en donde se encontraron variables distintas entre los individuos, a la vez, ya que Motupe es un distrito colindante de Olmos, presentan casi la misma topografía y clima, es por ello que no hubo problema en poder dejar el muestreo de ese distrito y haber escogido Reque para el muestreo. Se determinaron también coordenadas por cada individuo analizado (Anexo 6,7). De los individuos analizados, para la parte molecular se utilizaron las hojas jóvenes para la extracción de DNA.

### **4.2.5. Material de laboratorio**

#### **Materiales**

- Tijeras
- Tubos Eppendorf
- Soportes para tubos Eppendorf
- Guantes
- Bandejas y tapas de plástico.

Cajas de dilución de 96 pocillos, 1 mL de capacidad c/u  
Juego completo de pipetores  
Matraces Erlenmeyer (Pyrex)  
Morteros y pilón de porcelana  
Papel toalla  
Placas para electroforesis horizontal y vertical  
Probeta de 10, 100, 1000 mL  
Puntas plásticas de 10, 200 y 1000µl de capacidad

**Reactivos químicos.**

Agarosa  
Bromuro de etidio  
Ácido acético glacial  
Acrilamida  
Agua destilada  
Agua libre de nucleasas  
Alcohol isoamílico  
Azul de bromofenol  
Bind Silano adherente, Silane A 174  
Bromuro de hexadeciltrimetil amonio (CTAB) (Sigma)  
β – mercaptoetanol (Sigma)  
Carbonato de sodio  
Cloroformo  
Cloruro de magnesio solución 1 M  
Cloruro de sodio  
Desoxinucleótidos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)  
EDTA (ácido etilen diamino tetra-acético)  
Etanol absoluto 70% y 95%  
Formaldehído al 37%  
Formamida  
Glicerol  
Hidróxido de sodio  
Isopropanol  
Marcador de peso molecular (Gene Ruler TM 100bp DNA Ladder, Fermentas Life Sciences)  
Marcador de peso molecular, DNA del fago Lambda, Pst I  
Nitrato de plata  
Nitrógeno líquido  
Persulfato de amonio  
PVP  
Revelador y fijador de fotografía  
RNA asa A  
TEMED (N,N, N' N' – Tetra – metil etilen diamina)

Tiosulfato de sodio  
Tris (Tris [hidroxymethyl] amino ethan), (Merck)  
Úrea  
Xilén cianol

## **Equipos**

Autoclave  
Balanza analítica  
Bomba de vacío  
Cámara de baño María  
Cámara de flujo laminar  
Cámara de electroforesis horizontal  
Cámara de electroforesis vertical  
Cámara digital Canon  
Congelador a -4°C y a -20 °C  
Escáner  
Estufa  
Expositor de luz UV transluminador 2000  
Fuente de poder  
Horno microondas  
Centrifuga  
Refrigeradora  
Bandejas para tinción  
Shaker para bandejas  
Termociclador  
Vortex

## **4.3. Metodología.**

### **4.3.1. Tipo de estudio**

Este trabajo fue un estudio exploratorio o básico, experimental.

### **4.3.2. Diseño de Investigación**

La investigación fue del tipo experimental, prospectivo, transversal y analítico.

### **4.3.3. Instrumentos de recolección de datos.**

Lista de descriptores morfológicos, dispositivos mecánicos, iniciadores moleculares.

#### **4.3.4. Procedimientos y análisis estadístico de datos.**

Para los análisis morfológicos se procedió a hacer un muestreo en campo y posterior análisis de datos en programas informáticos, para la caracterización molecular fue un análisis de laboratorio y posteriormente un análisis informático, utilizando el programa NTSYS.

##### **4.3.4.1. Caracterización morfológica**

Para la caracterización morfológica se determinó una lista de 7 descriptores morfológicos cualitativos con sus respectivos estados, teniendo como base las características distintivas observadas en los individuos analizados, establecidos en la Universidad Nacional Agraria La Molina; no se tomaron descriptores cuantitativos debido a la falta de información para establecer los parámetros para cada parte de la planta a analizar, así como su influencia con el ambiente, en cambio los descriptores cualitativos fueron simplificados al escoger en su mayoría de aquellas características distintas sobre todo en las hojas.

Los descriptores para analizar las hojas se tomaron del tercio medio de cada rama tanto en los árboles, arbustos y matas postradas, en el caso del descriptor del fruto se tomó en consideración aquellos que ya estaban totalmente formados y grandes de acuerdo a las características conocidas, ya que no fue época de fruto, aun así se consideró este descriptor ya que la mayoría de los individuos analizados presentaban frutos grandes.

Descriptores de la planta.

##### **1. Hábito de crecimiento de la planta**

1= Árbol

2= Arbusto

3= Mata postrada

##### **2. Forma de la hoja**

1= Oblonga

2= Ovada

3= Lanceolada

- 3. Forma de la base de la hoja
  - 1= Redondeada
  - 2= Obtusa
- 4. Forma del Ápice de la hoja
  - 1= Obtuso
  - 2= Agudo
- 5. Disposición de las hojas
  - 1= Alternas
  - 2= Opuestas
  - 3= Alternas y opuestas
  - 4= Subopuestas
  - 5= Subopuestas y alternas
- 6. Pilosidad de la hoja joven
  - 1= Pilosa
  - 2= Muy pilosa
- 7. Forma del fruto
  - 1= Globoso
  - 2= Redondo
  - 3= Oblongo
  - 4= Ovoide
  - 5= Alargado
  - 6= Arriñonado
  - 99= Ausencia

#### **4.3.4.2. Análisis de datos morfológicos.**

Se calcularon las frecuencias de los caracteres cualitativos por cada individuo evaluado en el software Microsoft Excel 2010. Se realizó el análisis de conglomerados con el método UPGMA y, con la matriz de distancias, se construyó el dendograma correspondiente mediante el software NTSYS pc 2.2.<sup>48</sup>

#### **4.3.4.3. Caracterización Molecular.**

#### **4.3.4.4. Extracción de DNA.**

Para la extracción de DNA genómico, se utilizó el método CTAB de Doyle & Doyle<sup>49</sup>. Si bien, esta técnica es un procedimiento general para la extracción de DNA genómico, debido a que durante la ejecución de la técnica se puede obtener pequeñas cantidades de DNA mitocondrial o DNA cloroplástico, esta cantidad no es representativa debido a que la mayor cantidad de DNA extraído es proveniente del núcleo. Se recolectó en campo hojas jóvenes. Una vez obtenidas las muestras fueron puestas en recipientes con silica gel. Las hojas del sapote presentan abundante pilosidad y tierra arenosa propia de su hábitat, por eso se realizó un lavado después de la recolección en campo y antes de ser usadas para la extracción. El primer paso es la trituración de las hojas con nitrógeno líquido, luego el machacado fue puesto en un eppendorf de 1.5ml con 700  $\mu$ l de CTAB 2X, esta mezcla permite solubilizar las membranas y formar un complejo con el DNA, el buffer CTAB 2X (contenido: 2% CTAB, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA (pH 8); 100 mM Tris HCl (pH 8), 0.2% de  $\beta$ -mercaptoetanol, junto con el CTAB se añadió EDTA para lograr remover los cationes divalentes como el Magnesio y retardar la acción de las enzimas DNAsas, también se agregó el componente  $\beta$ -mercaptoetanol el cual limita la actividad de enzimas RNAsas mediante la apertura de puentes disulfuro, luego se incubó por 40 minutos a 65°C y se centrifugó a 14000 rpm durante 8 minutos, posterior a esto se recuperó el sobrenadante y se agregó 700  $\mu$ l de la mezcla cloroformo: alcohol isoamílico 24:1 para la eliminación de proteínas de la solución con DNA y se centrifugó nuevamente a 14000 rpm por 10 minutos, el sobrenadante, el cual contiene el complejo DNA – CTAB, se transfirió a un eppendorf limpio al cual se le agregó un volumen de 500  $\mu$ l de isopropanol helado, se mezcló por inversión y luego se colocó la mezcla a una temperatura de -20°C por unos 10 minutos.

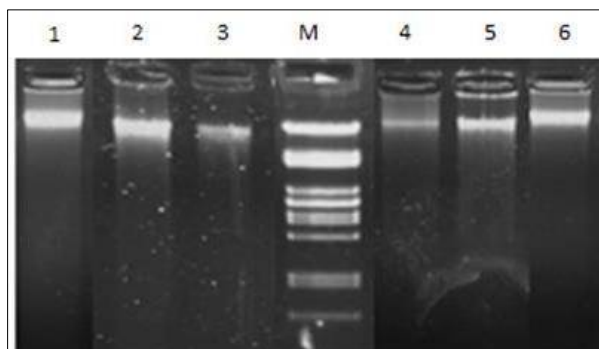
Pasado ese tiempo se centrifugó a 14000 rpm por 5 minutos para después desechar la fase acuosa. Se lavó y se centrifugó el pellet de DNA sucesivamente con etanol al 70% y 95%. Se dejó secar al aire libre toda la noche y luego se resuspendió en 50  $\mu$ l de agua MQ. Pasado ese tiempo le añadimos enzima RNase e incubamos por un



periodo de 20 minutos a 37°C para la degradación del RNA; finalmente guardamos el DNA en refrigeración a -20°C para su posterior uso (Anexo 8).

#### 4.3.4.5. Determinación de concentración y Calidad del DNA.

Para establecer la calidad y la concentración del DNA, proveniente de la extracción, se realizó una electroforesis horizontal en geles de agarosa al 1% (p/v), la cámara electroforética presentó un buffer TBE 1X. En los pocillos del gel de agarosa se cargó un total 10 µL, este determinado por 2 µL de DNA y 8 µL de SALB 1X, y posteriormente se sometió a un voltaje de 100v por una hora. Para la cuantificación, se corrió en el gel un marcador de peso molecular, en este caso fue el Fago Lambda cortado con la enzima PstI, migrando dentro del gel y permitiendo realizar una comparación con las bandas obtenidas de DNA del sapote. La primera banda del marcador mide 14800 pares de bases y su intensidad corresponde a una concentración de 280ng/ul. (Figura 2).



**Figura 2 Electroforesis en gel de agarosa (1%) visualizando las bandas de DNA extraído de hojas de sapote (*Capparis scabrida*); y el marcador lambda (M), cuya primera banda mide 14800 pares de bases (Pb).**

El DNA obtenido mostro una excelente calidad e integridad. Luego se realizó las diluciones de DNA de cada individuo en agua MQ. Se llegó a una concentración final de 50 ng/ µL. Esta concentración está determinada según Vos et al<sup>43</sup> para marcadores AFLP. (Anexo 9).

#### 4.3.4.6. Obtención de marcadores AFLP

Para la obtención de marcadores AFLP se siguió el protocolo de Vos et al<sup>43</sup>, con modificaciones (Figura 3). La técnica constó de 4 pasos:

##### **1. Digestión del ADN genómico con enzimas de restricción**

Para este paso se utilizaron dos enzimas de restricción, una de corte raro y otra de corte frecuente, con dicha digestión secuencial se generaron tres clases de fragmentos que difieren en las extremidades. Estas enzimas fueron EcoRI y MseI, y se ligaron con sus respectivos adaptadores (Cuadro 1).

Luego se incubaron las muestras a una temperatura de 37 °C por un periodo de 12 horas. Para demostrar que hubo digestión, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% se colocó 5 µL de DNA en cada pocillo para evidenciar el arrastre del DNA en el gel, esto debido a la digestión del DNA.

**Cuadro 1 concentración de cada uno de los reactivos utilizados en el proceso de digestión de DNA genómico**

Soluciones de Trabajo	[ ] Final
Buffer NEB #2	1X
BSA 10X	1X
EcoRI NEB	20U
MseI NEB	5U
DNA muestra	250ng
Agua grado Molecular	Csp
Volumen Final	10 µl

##### **2. Ligación**

Se ligaron los adaptadores que poseen terminales complementarios a los extremos resultantes del corte con las enzimas de restricción (Cuadro 2).

**Cuadro 2 concentración de cada uno de los reactivos utilizados en el proceso de ligación del DNA genómico**

<b>Soluciones de trabajo</b>	<b>[ ] Final</b>
Buffer Ligasa NEB 10X	1.25 X
Adaptador de EcoRI 1+2	1mM
Adaptador de MseI 1+2	1mM
Ligasa T4 NEB	120U
Agua grado Molecular	Csp
<b>Volumen Total</b>	<b>5 µl</b>

Luego, se dejó a temperatura ambiente por 16 horas. Finalmente, se diluyeron las muestras digeridas y ligadas en una proporción de 1 en 5.

### **3. Pre-Amplificación**

En la reacción de pre amplificación, los iniciadores utilizados no contienen ningún nucleótido arbitrario adicional, este paso se realiza para una complementación más específica (Cuadro 3).

**Cuadro 3 concentración de cada uno de los reactivos utilizados en el proceso de Pre-amplificación del DNA genómico**

<b>Soluciones de trabajo</b>	<b>[ ] Final</b>
Taq polimerasa (Fermentas)	0.5U
Buffer Taq 10X	1.25X
MgCl <sub>2</sub>	1.5mM
dNTPs	0.3mM
EcoRI + 0	0.5 µM
MseI + 0	0.5 µM
DNA muestra	100 ng
Agua grado Molecular	Csp
<b>Volumen Total</b>	<b>20 µl</b>

El programa de PCR utilizado en el Termociclador Peqstar (PeqLAB) fue el siguiente:

- 1: 72 °C por 2min.
- 2: 94 °C por 4min.
- 3: 94 °C por 30seg.
- 4: 56 °C por 1min.
- 5: 72 °C por 1 min.
- 6: 72 °C por 5min.
- 7: 4 °C x ∞

Finalmente se diluyó el producto de Pre-Amplificación en una proporción de 1 en 4 con agua ultra pura o libre de nucleasas y fue almacenado a -10° C para su posterior utilización en las amplificaciones selectivas.

#### **4. Amplificación selectiva**

Esta etapa es la de mayor intensidad de selección, los iniciadores utilizados poseen hasta tres nucleótidos arbitrarios adicionales, con lo que la amplificación se hará más selectiva. La especificidad de esta unión es determinada por el número de nucleótidos selectivos que posea el iniciador AFLP (Cuadro 4)

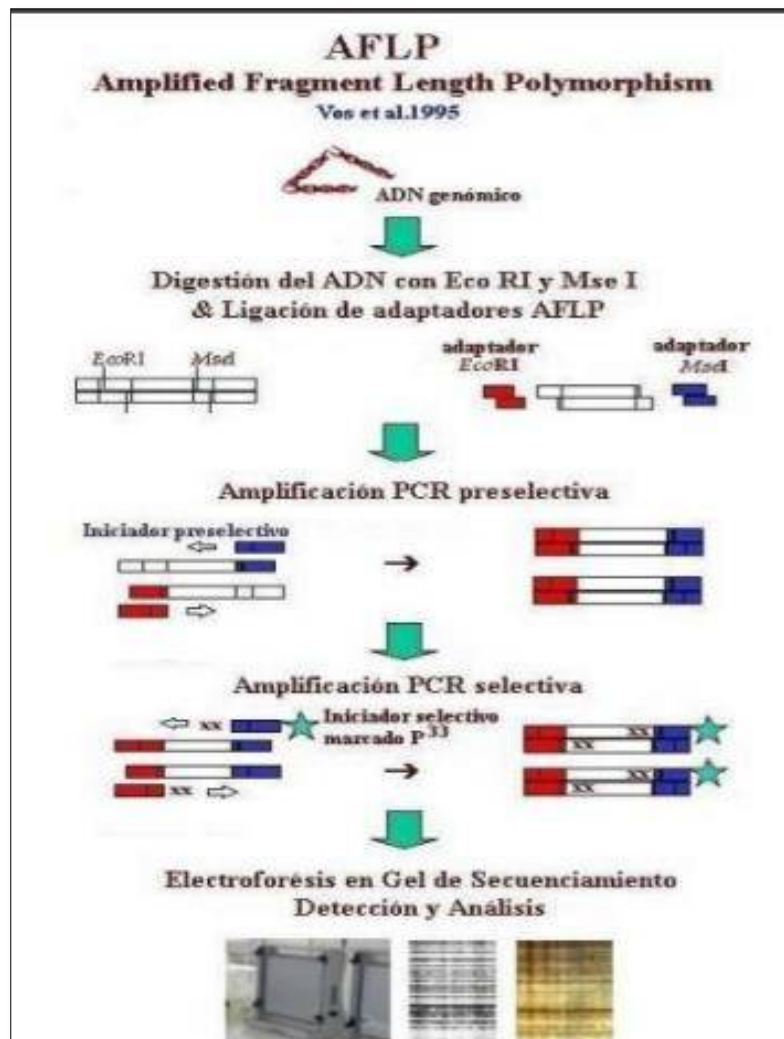
**Cuadro 4 concentración de cada uno de los reactivos utilizados en el proceso de amplificación selectiva del DNA genómico**

<b>Soluciones de trabajo</b>	<b>[ ] Final</b>
Taq polimerasa (Fermentas)	0.5U
Buffer Taq 10X	1.1X
MgCl <sub>2</sub>	1.5mM
dNTPs	0.3 mM
EcoRI + 3	2 µM
MseI + 3	0.3 µM
DNA Pre-Amplificado	2 µl
Agua grado Molecular	Csp
<b>Volumen Total</b>	<b>10 µl</b>

El programa de PCR utilizado en el termociclador Peqstar (PeqLAB) fue el siguiente:

- 1: 94 °C x 4 min.
- 2: 94 °C x 20seg.
- 3: 65 °C x 30 seg.
- 4: 72 °C x 2 min.
- 5: 94 °C x20 seg.
- 6: 65 °C X 30seg. bajando 1 °C por ciclo
- 7: 72 °C 2 min
- 8: 94 °C x20seg.
- 9: 56°C 30 seg.
- 10: 72°C 2 min.
- 11: 60 °C x 30 min.
- 12: 4 °C x

Luego, el producto amplificado fue almacenado a 4 °C hasta la electroforesis en geles de poliacrilamida al 4 por ciento.



**Figura 3 Pasos de la técnica molecular AFLP**

#### **4.3.4.7. Selección de iniciadores de combinaciones de AFLP**

Con la finalidad de seleccionar los iniciadores más polimórficos, con mayor información y mejor intensidad y nitidez de banda; se realizó inicialmente, un tamizado de 6 individuos, se escogió un individuo por cada distrito, este individuo fue elegido al azar y se utilizaron 16 iniciadores diferentes (Anexo 10).

Con esos criterios se seleccionaron las 6 combinaciones de iniciadores que se utilizaron para la evaluación de todas las accesiones (Cuadro 5)

**Cuadro 5 Iniciadores utilizados en la amplificación selectiva con sus respectivas secuencias**

N°	Iniciador	Secuencia	Iniciador	Secuencia
1	E40	5-GACTGCGTACCAATTC  ACG-3	M55	GATGAGTCCTGAGTAA  CGA-3
2	E44	5-GACTGCGTACCAATTC  ATC-3	M48	GATGAGTCCTGAGTAA  CAC-3
3	E33	5-GACTGCGTACCAATTC  AAG-3	M49	GATGAGTCCTGAGTAA  CAG-3
4	E32	5-GACTGCGTACCAATTC  AAC-3	M47	GATGAGTCCTGAGTAA  CAA-3
5	E40	5-GACTGCGTACCAATTC  ACG-3	M35	GATGAGTCCTGAGTAA  ACA-3

#### **4.3.4.8. Electroforesis del producto amplificado AFLP.**

Los productos de la amplificación selectiva fueron separados con un equipo de electroforesis vertical en geles denaturantes de poliacrilamida al 6 por ciento y úrea 5 M, con un espesor de 0.4 mm. Al producto de amplificación se le agregó 5µl de tampón de carga para geles de poliacrilamida (Formamida 96 por ciento v/v, 10 mM EDTA pH 8.9, azul de bromofenol 0.05 p/v y xilencianol 0.05 p/v). Posteriormente, las muestras fueron denaturadas a 95 °C por 5 minutos. Inmediatamente después, se cargaron de 5 a 6 µL de las mismas, en el gel de poliacrilamida. El tiempo de corrida, dependió del voltaje aplicado, así como el tamaño de los fragmentos esperados. Se trabajó con dos opciones: corridas electroforéticas de 4 horas a 1600 V o toda 45 la noche a 350 V, según la disponibilidad de los equipos.

Una vez obtenido el Dna de la amplificación selectiva se realiza una electroforesis vertical para su visualización en geles de acrilamida (Anexo 11).

#### **4.3.4.9. Tinción y revelado de geles de poliacrilamida.**

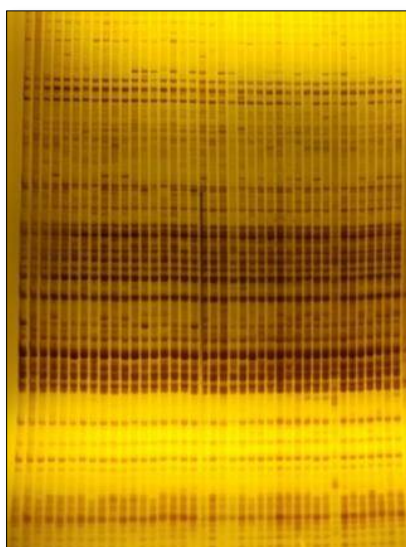
La tinción y revelado de los geles de poliacrilamida se hizo basándose en los protocolos de Bassam et al.<sup>50</sup>, con algunas modificaciones. Al finalizar la electroforesis, el aparato fue desmontado, el vidrio con el gel adherido se separó de la cámara y se colocó en una solución de ácido acético al 10 por ciento durante 20 minutos para la fijación del DNA. Luego se retiró el exceso de ácido con agua destilada. En seguida para la tinción, se colocó el gel en una solución que contiene nitrato de plata (1g/l) por 30 minutos. Finalizado este tiempo, inmediatamente se lavó el gel con agua destilada durante 6 segundos. Posteriormente se revelaron los productos de PCR con una solución que contiene: carbonato de sodio (30 g/l), formaldehído al 0.05 por ciento y tiosulfato de sodio (2mg/l) hasta la visualización

de las bandas. Para detener la reacción de la solución reveladora, el gel se colocó en una solución de ácido acético al 10% durante diez minutos y finalmente se lavó con agua destilada (Anexo 12)

Seguimos el protocolo de Bassam et al.<sup>50</sup> Con modificaciones hechas en el laboratorio de biotecnología.

#### **4.3.4.10. Detección de marcadores AFLP**

Para la detección de la electroforesis en los geles de poliacrilamida de los productos amplificados se utilizó el método de tinción con nitrato de plata. La metodología está basada en la reducción del nitrato de plata por el formaldehído, en un medio básico (pH=12) proporcionado por la solución de carbonato de sodio. Los iones de  $\text{Ag}^+$  son reducidos a plata metálica ( $\text{Ag}^0$ ) solamente en la presencia de una biomolécula, como DNA, formando un complejo visible. Se realiza el procedimiento de tinción con nitrato de plata por el formaldehído (Figura. 4).



**Figura 4 Visualización de bandas de DNA genómico mediante la técnica de electroforesis vertical en geles de poliacrilamida.**

#### **4.4. Análisis estadístico**

Se realizó la lectura con un transluminador de luz blanca. Solo se analizaron y registraron las bandas que tuvieron una gran notoriedad así como aquellas que no

se presentaban. La presencia de bandas se analiza con un “1” y a la ausencia con un “0”.

#### **4.4.1. Selección del coeficiente de similitud.**

Para el análisis de la similitud genética entre individuos, donde se utilizan datos binarios como en el caso de los marcadores AFLPs, puede usarse los índices de Dice, Jaccard o de Similitud de Emparejamiento Simple (en inglés, Simple Matching coefficient, o SM) <sup>51</sup>. En este caso el coeficiente de similitud se estimó calculando el coeficiente de SM, para estos cálculos se utilizó el programa NTSYS pc 2.2 Sistema de Análisis Multivariado de taxonómica Numérica<sup>48</sup>.

#### **Formula del coeficiente de similitud:**

$$S_{ij} = \frac{a + d}{a + b + c + d}$$

Dónde:

$S_{ij}$  = Similitud entre los individuos i y j

a = Numero de pares (1,1)

b = Numero de pares (1,0)

c = Numero de pares (0,1)

d = Numero de pares (0,0)

#### **4.4.2. Análisis de agrupamiento.**

Los dendogramas se elaboraron siguiendo el algoritmo UPGMA (unweighted pair-group method with arithmetic means) de la opción SAHN (Sequential agglomerative hierarical nested cluster analysis) del programa NTSYS<sup>50</sup>.

UPGMA es un método basado en distancias genéticas, la distancia se expresa como la fracción de sitios que difieren entre dos secuencias en un apareamiento múltiple. Así, que la suposición que a mayor tiempo transcurrido de divergencia a partir de un ancestro común, más diferirán las secuencias, pero no siempre es verdadera. El método UPGMA así como el método de Neighbor Joining (NJ) generan una matriz de distancia, calculado para cada par de taxa (entrada) la distancia, o la fracción de distancias entre dos secuencias.



#### 4.4.3. Índice de contenido polimórfico (PIC).

El valor de PIC de un marcador es definido como la fracción informativa esperada de la descendencia de un tipo de pedigree. La informatividad del marcador puede ser medida cuantitativamente.

Donde  $p_i$  es la frecuencia del alelo marcado y  $n$  el número de alelos diferentes, para el caso de AFLP esto es  $n = 2$ . Es decir para determinar el valor de PIC primero se debió determinar la frecuencia de cada alelo<sup>52</sup>.

**Fórmula del PIC:**

$$1 - \sum_{i=1}^n p_i^2 - \left( \sum_{i=1}^n p_i^2 \right)^2 + \sum_{i=1}^n p_i^4$$

#### 4.4.4. Análisis de Varianza Molecular.

Se calculó y analizó la varianza de las frecuencias génicas dentro y entre poblaciones de Sapote usando el análisis de varianza molecular (AMOVA) incluido en el programa Arlequín 3.1.<sup>52</sup>

En AMOVA se divide la varianza total en términos de covarianza entre grupos ( $\sigma^2a$ ), entre poblaciones dentro de grupos ( $\sigma^2b$ ) y dentro de poblaciones ( $\sigma^2c$ )<sup>53</sup>.

**Fórmula de la AMOVA:**

$$\sigma^2t = \sigma^2a + \sigma^2b + \sigma^2c$$

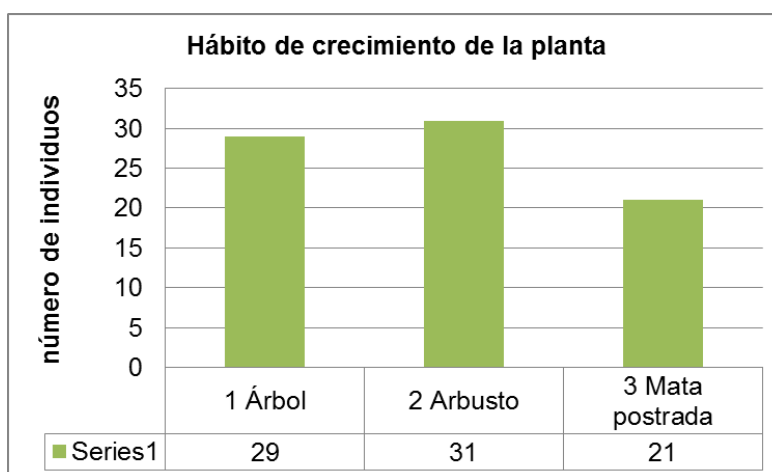
Dichas covarianzas están generadas a partir de la suma de desviaciones de cuadrados (SSD) divididas entre sus grados de libertad (caso de covarianza  $\sigma^2c$ ) u otros factores corregidos (además covarianzas que tienen un factor de corrección “ $n$ ”). La suma de estas nos dará la varianza total. La SSD a su vez se deriva de las diferencias o mutaciones entre individuos provenientes de diferentes categorías (entre grupos, entre poblaciones dentro de grupos y dentro de poblaciones). Las covarianzas dependen básicamente de las diferencias o mutaciones entre individuos. Al momento de definir grupos de poblaciones, lo que se está definiendo en una estructura genética particular que será evaluada, en este trabajo se realizó el agrupamiento de los sapotes por cada distrito donde se les encontró.

## V. RESULTADOS

### 5.1. Resultados morfológicos

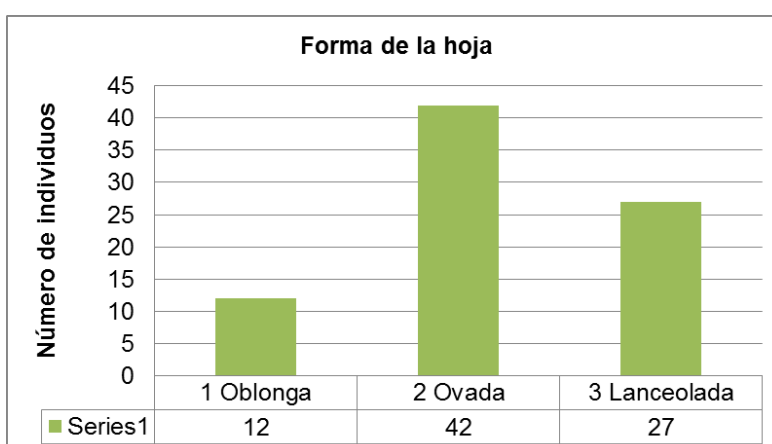
#### 5.1.1. Descriptores morfológicos cualitativos

Para el primer descriptor hábito de crecimiento de la planta, 31 individuos presentaron forma de arbusto, seguido de 29 individuos con predisposición de ser árboles, y 21 individuos se presentaron como mata postrada (Figura 5) (Anexo 13).



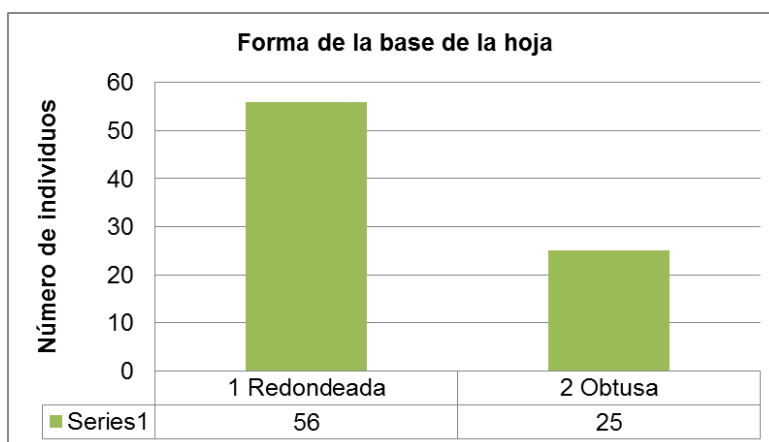
**Figura 5 Distribución de individuos de acuerdo a sus características morfológicas, teniendo en cuenta los descriptores para el primer carácter y sus estados**

El segundo descriptor mostró 42 individuos con hoja ovada, seguido de 27 individuos con hoja lanceolada y solo 12 individuos con hoja oblonga (Figura 6) (Anexo 13).



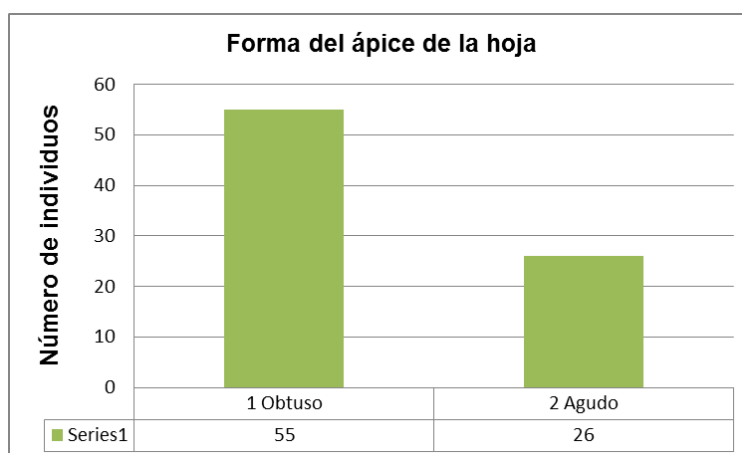
**Figura 6 Distribución de individuos de acuerdo a sus características morfológicas, teniendo en cuenta los descriptores para el segundo carácter y sus estados**

La base de hoja presentó solo dos variaciones, 56 individuos presentaron base de hoja redondeada y 25 individuos presentaron base obtusa (Figura 7) (Anexo 13).



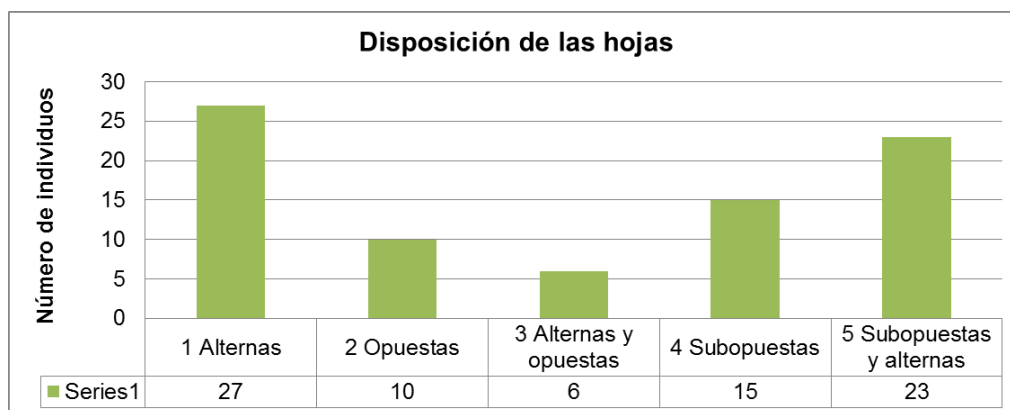
**Figura 7 Distribución de individuos de acuerdo a sus características morfológicas, teniendo en cuenta los descriptores para el tercer carácter y sus estados**

Asi mismo para la forma del ápice de la hoja, 55 individuos presentaron ápice obtuso y 26 individuos ápice agudo (Figura 8) (Anexo 13).



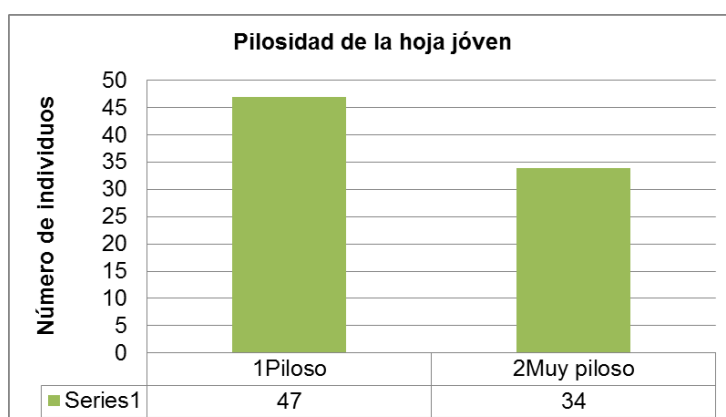
**Figura 8 Distribución de individuos de acuerdo a sus características morfológicas, teniendo en cuenta los descriptores para el cuarto carácter y sus estados**

Este descriptor disposición de la hoja mostró una mayor variabilidad en relación a sus estados, presentándose 27 individuos con hojas alternas, 23 individuos con hojas subopuestas y alternas, 15 individuos con hojas subopuestas, 10 individuos con hojas opuestas y solo 6 individuos con hojas alternas y opuestas. (Figura 9) (Anexo 13)



**Figura 9 Distribución de individuos de acuerdo a sus características morfológicas, teniendo en cuenta los descriptores para el quinto carácter y sus estados**

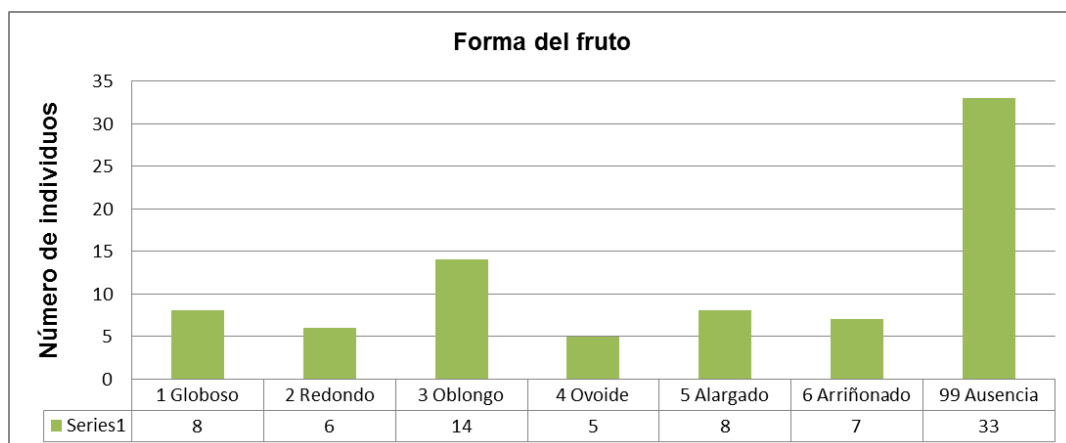
La pilosidad de los individuos destacaron por una presencia normal de pelos y otros individuos con una abundante pilosidad, se encontraron 47 individuos con hojas pilosas y 34 individuos con hojas muy pilosas. (Figura 10) (Anexo 13)



**Figura 10 Distribución de individuos de acuerdo a sus características morfológicas, teniendo en cuenta los descriptores para el sexto carácter y sus estados**

El descriptor forma del fruto mostró 14 individuos con fruto oblongo, 8 individuos presentaron forma globosa, así como también 8 individuos compartieron la forma alargada de los frutos, 7 frutos fueron arriñonados, 6 frutos redondos, 5 individuos con frutos ovoides; también se contabilizó 33 individuos sin fruto, esto debido a que en parte fueron matas postradas a las cuales no se les encontró fruto alguno así como también en algunos arbustos, por otra parte también se tuvo en cuenta los frutos por su tamaño predeterminado, esperando solo su maduración, ya que en la

época en que se fue a recolectar estaba cerca de su etapa de maduración, es por ello también que algunos arbustos carecieron del fruto, no obstante considerando en su mayoría la presencia de frutos, se continuó con la descripción. (Figura 11) (Anexo 13)



**Figura 11 Distribución de individuos de acuerdo a sus características morfológicas, teniendo en cuenta los descriptores para el séptimo carácter y sus estados**

### 5.1.2. Dendograma de caracterización morfológica

El dendograma morfológico se separa en 2 grupos a un coeficiente de disimilitud 1.65 y a un coeficiente de 1.29 tenemos 3 subgrupos; estos se caracterizan por presentar individuos que se diferencian de otros por la predisposición sobre algunos descriptores y más aun con sus estados (Figura 12).

El grupo 1 presenta 56 individuos, destacan los siguientes descriptores, hábito de crecimiento, y el estado para mata postrada con un 46%; forma de la hoja ovada con un 41%, en este grupo todos los individuos comparten la base redondeada, destacando también el ápice obtuso con un 100%, descriptor de disposición de las hojas, destaca el estado de hojas alternas con un 36%, seguido de hojas subopuestas y alternas con un 32%. Un 58% de pilosidad y en la forma del fruto, destaca con un 21% la forma oblonga.

El grupo 2 presenta 25 individuos, destacándose los descriptores, de hábitat con el estado de árbol con un 72%, hoja oblonga con un 64%, predomina la base de la hoja obtusa con un 100%, con igual porcentaje destaca el ápice agudo, en la

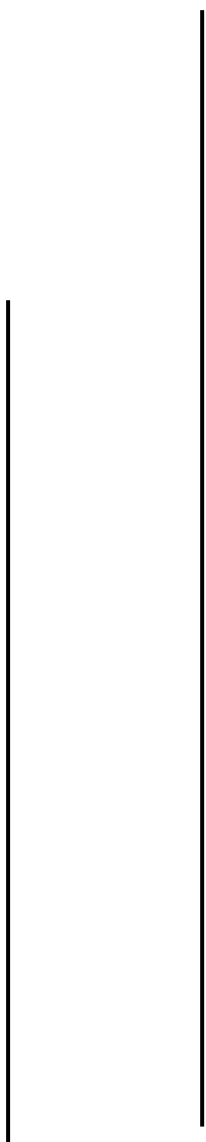
predisposición de las hojas sobresalieron las hojas alternas con un 28%, seguida de hojas subopuestas con un 24% y las hojas subopuestas y alternas con un 16%, la pilosidad con un 60% y en la forma del fruto destacó la forma alargada con un 24%.

El dendograma también se separa en 3 subgrupos, el grupo 1 se separa en 2 subgrupos, mientras en el segundo grupo se mantuvieron todos los individuos sin ninguna separación de acuerdo a lo analizado en el dendograma en relación a los descriptores y sus estados.

El primer subgrupo se destacó el hábito de árbol con un 52%, seguido de mata postrada con un 44%, en su mayoría fueron hojas ovadas con un 40%, la base obtusa y el ápice agudo fueron para todos los individuos, teniendo un total de 100%, la disposición de las hojas fueron alternas con un 40%, se destacó una abundante pilosidad con un 64%, en la forma del fruto se presenció en su mayoría la forma oblonga con un 36%, seguida de la forma redondeada con un 29% y la forma globosa con un 23%.

Para el segundo subgrupo, se presenció el hábito de mata postrada con un 48%, seguido de árboles con un 35%, la hoja fue lanceolada con un 42%, la base redondeada y el ápice agudo comparten un 100% de predisposición en relación a estos individuos, respectivamente. La disposición de las hojas fueron alternas y subopuestas con un 42%, seguido de las hojas alternas con un 32%, en este grupo la mayoría de individuos careció de fruto.

Se obtuvieron 10 duplicados, lo cual indica que estos individuos comparten en su totalidad todas las características analizadas. El individuo Pítipo 1 es igual al de Nueva Arica 31, Reque 68 con Reque 73, también los individuos de Pítipo 12 con Pítipo 18 son iguales, Olmos 53 con Olmos 56, Pítipo 8 igual con Pítipo 11, Nueva Arica 39 con Reque 80, Pítipo 4 con Saña 45, Nueva Arica 34 con Saña 43, Pítipo 9 con Reque 77 con, Salas 23 con Olmos 62 (Cuadro 6).



**Figura 12 Dendrograma obtenido mediante el programa Ntsys 2.20 de la caracterización morfológica, demostrando un análisis de agrupamiento.**

**Cuadro 6 Individuos duplicados presentando los mismos valores para los descriptores analizados y sus estados.**

<b>Descriptores Individuos</b>	<b>Forma de la hoja</b>	<b>Hábito de crecimiento</b>	<b>Pilosidad de la hoja joven</b>	<b>Forma del fruto</b>	<b>Forma de la base de la hoja</b>	<b>Forma del ápice de la hoja</b>	<b>Disposición de las hojas</b>
Pítipo1	2	1	2	9	1	1	1
Nueva Arica31	2	1	2	9	1	1	1
Reque68	2	1	2	9	1	1	2
Reque73	2	1	2	9	1	1	2
Pítipo12	3	3	2	9	1	1	1
Pítipo18	3	3	2	9	1	1	1
Olmos53	2	3	1	9	1	1	5
Olmos56	2	3	1	9	1	1	5
Pítipo8	3	2	1	1	1	1	5
Pítipo11	3	2	1	1	1	1	5
Nueva Arica39	2	2	1	2	1	1	5
Reque80	2	2	1	2	1	1	5
Pítipo4	1	3	1	1	1	1	1
Saña45	1	3	1	1	1	1	1
Nueva Arica34	2	2	1	1	1	1	1
Saña43	2	2	1	1	1	1	1
Pítipo9	2	1	2	9	2	2	4
Reque77	2	1	2	9	2	2	4
Salas23	2	1	1	9	2	2	5
Olmos62	2	1	1	9	2	2	5

## **5.2. Análisis molecular**

### **5.2.1. Selección de los iniciadores AFLP**

De los 16 primers iniciales a los cuales se le hizo el tamizado, solo se escogieron los cinco más polimórficos. Los iniciadores que determinaron más bandas polimórficas fueron el E33 M49 con un total de 24 bandas polimórficas, seguido del E40 M35 con un total de 18 bandas amplificadas y por último el E32 M47 con 17 bandas polimórficas (Cuadro 9).



**Cuadro 7 Determinación del número de bandas monomórficas y polimórficas y sus respectivos porcentajes por cebador empleado.**

Combinación de iniciadores	Número de bandas monomórficas	Número de bandas polimórficas	Número total de bandas	% de polimorfismo
E40 M55	19	12	31	14,45
E44 M48	18	12	30	14,45
E33 M49	35	24	59	28,91
E32 M47	21	17	38	20,98
E40 M35	30	18	48	21,68
Total	123	83	206	100

### 5.2.2. Índice de Contenido Polimórfico (PIC)

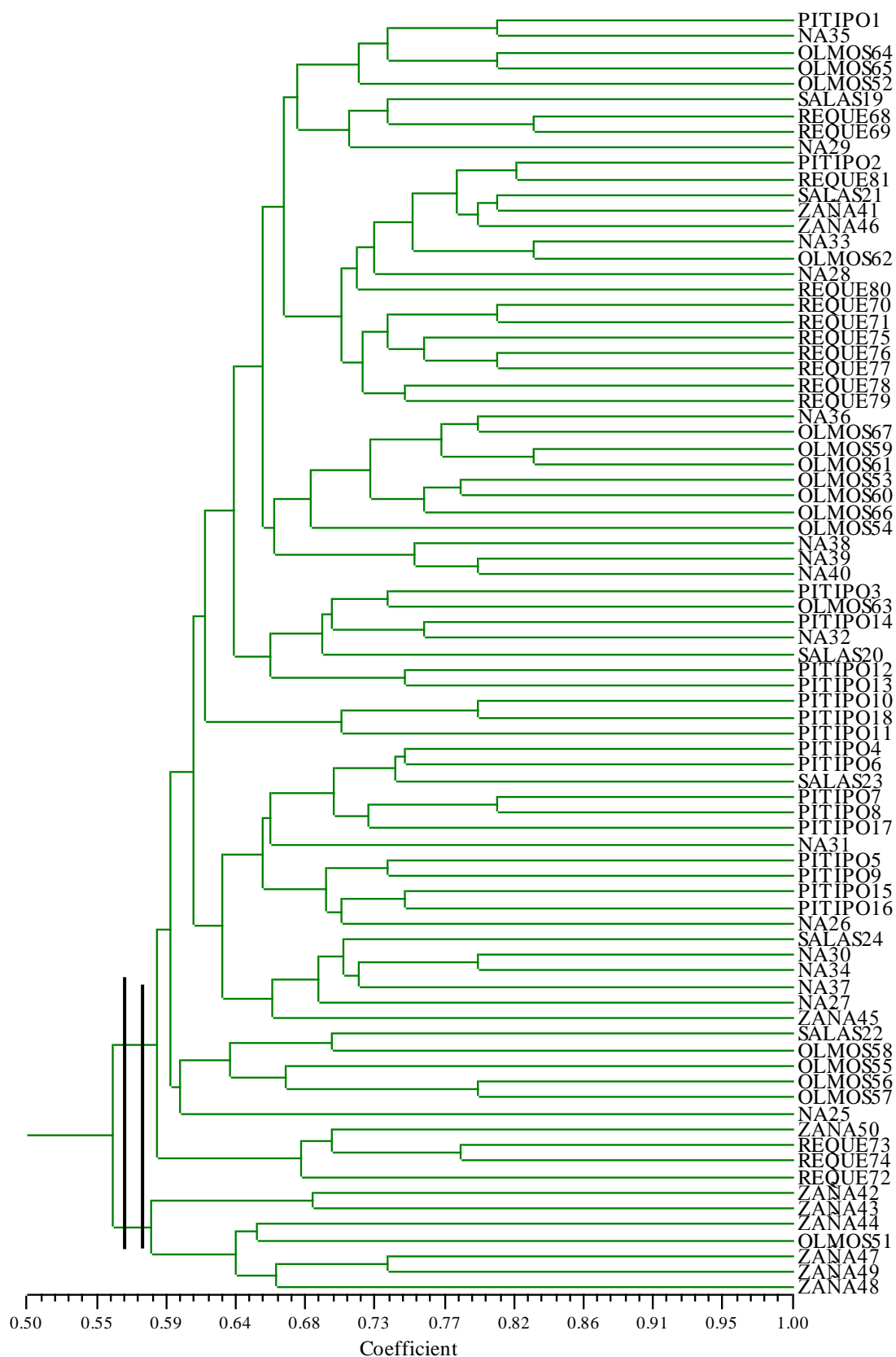
El Índice de contenido polimórfico me determinó el iniciador más polimórfico, el cual fue, E33M49 con un Pic de 7,18, seguido del E40M35 con un Pic de 5,99. Esto indica que estos iniciadores son los más polimórficos para el estudio llevado a cabo en sapote (Cuadro 10).

**Cuadro 8 Determinación del cebador con el índice de contenido polimórfico más alto.**

Combinación de iniciadores	PIC
E40 M55	3.4099
E44 M48	3.7884
E33 M49	7.1817
E32 M47	4.6793
E40 M35	5.9969

### **5.2.3. Dendograma de caracterización molecular**

El dendograma molecular presenta su diferencia en base a las 83 bandas polimórficas, y tomando a uno el coeficiente de simple Matching (SM) se generó el dendograma molecular para los individuos del sapote. No se reportaron duplicados, como si se notó en la parte morfológica. A un coeficiente de 0.56 se observa claramente dos grupos, el primero constituido por 74 individuos, y el segundo por 7 individuos. El primer grupo constituido por individuos de los seis distritos de la región Lambayeque, y el segundo grupo constituido por 7 individuos de Zaña y Olmos. Se registró también dos subgrupos dentro del primer grupo a un coeficiente de 0.58, el primer subgrupo formado por individuos de los seis distritos, de Pítipo, Nueva Arica, Olmos, Salas, Reque y Zaña, el segundo subgrupo formado por individuos de Zaña y Reque, y dos subgrupos para el segundo grupo, el primer subgrupo presentó individuos de Zaña, y el segundo subgrupo individuos de Zaña y Olmos. (Figura 13)



**Figura 13 Distribución de los individuos en un dendrograma determinado mediante el programa NTSYS**

#### 5.2.4. Análisis de varianza molecular (AMOVA)

Estos datos reflejan la variación dentro de los distritos, esto quiere decir que la mayor variación se observa entre los individuos dentro de los distritos con un 91.01%, mientras que la variación entre distritos es de apenas de un 8,98%.

Otro de los datos arrojados por el Amova es el índice de fijación, este dato viene determinado por las frecuencias alélicas que varían entre distritos, presentándose un índice de 0,089, el cual indicó y se corroboró con los otros datos la baja variación entre distritos (Cuadro 9).

**Cuadro 9 Porcentaje de variación entre distritos a partir de un análisis de varianza molecular (AMOVA)**

Fuente de variación	Grados de libertad	Componentes de varianza	Porcentaje de variación (%)
Entre Distritos	170.133	1.45635	8.98495
Entre individuos dentro de los distritos	1106.435	14.75246	91.01505
Total	1276.568	16.20881	100
Valor de Fst	0.08985		

P valor <0.001

## VI. DISCUSION

El sapote<sup>27</sup> se caracteriza por encontrársele como arbusto y árbol; en nuestro estudio fueron los dos hábitos que más destacaron, no obstante se encontró individuos con habito de ser matas postradas; su forma de hoja generalmente es lanceolada, oblonga, aguda a redondeada y apiculada en el ápice, a veces obtusa en el ápice y la base, en este estudio se encontró en su mayoría hojas ovadas y lanceoladas, determinándose nuevas formas para la hoja del sapote, el ápice destacó por ser obtuso, y la base redondeada, la predisposición de las hojas según la literatura son únicamente alternas, no obstante aparte de la disposición alterna, se encontraron hojas opuestas, subopuestas, alternas, subopuestas y alternas, así como alternas y opuestas en un mismo individuo. El fruto presenta varias formas como ovoide, elipsoide, globoso, redondo, ligeramente asimétrico y siempre colgante, es así como se le encontró, pero también predominaron otras formas como la oblonga, arriñonado, esta última, es una nueva forma registrada en este trabajo, otra investigación también destaca una nueva forma de fruto, pseudoamfisarco, no estando presente esta forma en los individuos estudiados<sup>1</sup>.

En otras especies forestales se manifiesta que la mayoría de especies anemófilas y alógamas mantienen una mayor diversidad dentro de poblaciones que entre ellas<sup>54</sup>. En el caso de este estudio se encontró una mayor variabilidad entre individuos del mismo distrito.

Las hojas determinan el proceso fotosintético de los árboles, también son las que se destacan en los ciclos fenológicos y los estados de crecimiento, así mismo la forma foliar se basa a nivel genético; no obstante la selección natural y aquella que es ejercida por la mano del hombre, pueden presentar varios fenotipos relacionado también con su ecosistema<sup>55</sup>. Las hojas del sapote analizados presentaron muchas variables, tanto en la forma, ápice y borde, destacándose también una pilosidad por el ambiente que la rodea.

*Alnus acuminata* una especie forestal, se caracteriza por presentarse como dos ecotipos, uno en la cordillera central y occidental, donde se le denomina cerezo, es

un árbol que puede superar los 40m de altura y 70cm de diámetro, mientras en la cordillera oriental, donde se llama aliso, es de habito arbustivo y en algunos sitios solo alcanza una altura de 10m<sup>56</sup>. El sapote aún no podría ser considerado un ecotipo, aun así sus variantes fueron encontradas como árbol, arbusto y mata postrada en una misma zona boscosa.

A pesar de que la continuidad de la mayoría de especies forestales no se considera amenazada al estar ampliamente distribuida, las especies arbóreas ven amenazado su futuro en muchas localidades, con la consiguiente reducción de su variabilidad intraespecífica. Frecuentemente se ha prestado mayor atención a los rangos principales de distribución de las especies (por ejemplo Centroamérica) que a las zonas marginales del sur (Mediterráneo), donde su valor de conservación permanece infravalorable<sup>57</sup>. La distribución poblacional del sapote presentó una variabilidad intraespecífica notoria debiéndose establecer otros parámetros para un mejor cuidado o preservación de la especie en su ambiente.

No hay muchos registros de análisis de este tipo sobre todo a nivel molecular para el sapote, no obstante el tipo de marcador utilizado en esta investigación fue de mucha ayuda ya que los AFLPs abarcan todo el genoma, haciendo un estudio por locus; encontrándose una variabilidad entre locus intraespecífica para los 81 individuos, teniendo como marcador más polimórfico al E33M49, arrojando un polimorfismo del 28%; esto es solo el inicio para un estudio mayor de esta especie forestal, debido a que no se conoce nada sobre su genoma, ni su disposición alógama o autógama, así mismo conocer a detalle su número cromosómico.

## **VII. CONCLUSIONES**

- 7.1.** Se determinó siete descriptores, donde se destacaron los individuos con hábitat de árboles con un 72%, hoja oblonga con 64%, base obtusa con un 100%, hojas alternas con un 36%, pilosidad del 60% y fruto alargado con un 24%.
- 7.2.** Se realizó un estudio morfológico y molecular de 81 individuos dentro de 6 distritos de la región Lambayeque, validando la hipótesis de que existe variabilidad intraespecífica del sapote (*Capparis scabrida*), determinándose un 41% de variabilidad entre los individuos, mas no entre distritos, en este último caso la variabilidad solo fue de un 8,88%.
- 7.3.** De los iniciadores, el más polimórfico fue el E33M49 con un Pic de 7.18 y en iniciador menos polimórfico fue el E40M55 con un Pic de 3.40. Determinando el marcador E33M49 con un 28,91% de polimorfismo.

## **VIII. RECOMENDACIONES**

8.1 Se recomienda realizar un estudio de otras especies forestales de la región Lambayeque, para establecer parámetros de investigación.

8.2 Se deben evaluar otras especies forestales dentro y fuera de la región Lambayeque.

8.3 Se debería trabajar con más especies forestales a nivel molecular para así establecer un catálogo de cebadores apropiados para su caracterización.



## IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Enrique, G. El Árbol De Sapote (*Capparis scabrida*) Como Recurso Forestal. (2013). Recuperado de [http://www.lamolina.edu.pe/vlir/?wpfb\\_dl=8](http://www.lamolina.edu.pe/vlir/?wpfb_dl=8)
2. Rodríguez, E. *Capparis scabrida* (Capparaceae) una especie del Perú y Ecuador que necesita planes de conservación urgente. *Arnaldoa*, 14(2):269-282. (2007). Recuperado de <http://revistas.concytec.gob.pe/pdf/arnal/v14n2/a08v14n2.pdf> 2007
3. Figueroa, J. Composición de la dieta del oso andino *Tremarctos ornatus* (Carnívora: Ursidae) en nueve áreas naturales protegidas del Perú. *THERYA*, agosto, 2013. Vol.4 (2):327-359. DOI: 10.12933/therya-13-108
4. Muñoz, C., Altamirano, G. Control de maduración de la carambola (*Averrhoa carambola* L.) mediante el uso de biofilm formulado a partir de la resina del árbol de zapote (*Capparis scabrida* H.B.K) – *Rev. Ingeniería: Ciencia, Tecnología e Innovación* VOL 1/Nº 1. 2014. Recuperado <http://servicios.uss.edu.pe/ojs/index.php/ING/article/view/109>
5. LLatas, S. Estudio De Biodiversidad Continental De Lambayeque. (2010). Recuperado de [http://ot.regionlambayeque.gob.pe/public/ckfinder/userfiles/files/013\\_BIODIVERSIDAD\\_PARTE%201\(1\).pdf](http://ot.regionlambayeque.gob.pe/public/ckfinder/userfiles/files/013_BIODIVERSIDAD_PARTE%201(1).pdf)
6. Informe del peru sobre la situación de los recursos genéticos forestales al año 2011 (Documento preparado para la FAO, en el marco de la Evaluación de la Situación de los Recursos Genéticos Forestales del Mundo). Documento preparado para la FAO, en el marco de la Evaluación de la Situación de los Recursos Genéticos Forestales del Mundo). Lima, Perú, Julio del 2012. Recuperado de <http://www.fao.org/3/a-i3825e/i3825e53.pdf>

7. Instituto nacional de estadística e informática. Perú: Anuario de Estadísticas Ambientales 2015. Lima- Perú. Diciembre, 2015. Disponible en [https://www.inei.gob.pe/media/MenuRecursivo/publicaciones\\_digitales/Est/Lib1342/libro.pdf](https://www.inei.gob.pe/media/MenuRecursivo/publicaciones_digitales/Est/Lib1342/libro.pdf)
8. Hidalgo, R. Variabilidad genética y caracterización de especies vegetales. Boletín Técnico IPGRI N°08. Disponible en [www.biodiversityinternational.org/fileadmin/\\_migrated/uploads/tx\\_news/Análisis\\_estadístico\\_de\\_datos\\_de\\_caracterización\\_morfológica\\_de\\_recursos\\_fitogenéticos\\_894.pdf](http://www.biodiversityinternational.org/fileadmin/_migrated/uploads/tx_news/Análisis_estadístico_de_datos_de_caracterización_morfológica_de_recursos_fitogenéticos_894.pdf)
9. Loo, J. Manual de genética de la conservación. Principios aplicados de genética para la conservación de la diversidad biológica. ISBN: 978-607-715-007-7 Impreso en México. Primera Edición 2011. Disponible en [http://www.fec-chiapas.com.mx/sistema/biblioteca\\_digital/manual-genetica-web.pdf](http://www.fec-chiapas.com.mx/sistema/biblioteca_digital/manual-genetica-web.pdf)
10. Domínguez, D. Metodología para la Ordenación Forestal Sostenible. Revista científica avances. Vol. 17, No.4 octubre-diciembre, 2015. Disponible <https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/5350925.pdf>
11. Palomino, Y. et al. Especies forestales nativas con potencial para reforestación en la provincia de Oxapampa y fichas técnicas de las especies de mayor prioridad. Oxapampa, Mayo 2003. Disponible en <http://www.infobosques.com/descargas/biblioteca/70.pdf>
12. Ministerio de agricultura dirección general forestal y de fauna silvestre. Perú forestal en números año 2011. MINAG-DGFFS. LIMA – PERÚ. 2012. Disponible en [http://intranet.serfor.gob.pe/serfor/wp-content/uploads/2016/03/ANUARIO\\_PERU\\_FORESTAL\\_2011.pdf](http://intranet.serfor.gob.pe/serfor/wp-content/uploads/2016/03/ANUARIO_PERU_FORESTAL_2011.pdf)
13. Valle, O. et al. Priorización de especies maderables nativas para fuente de semillas en molinopampa, Amazonas – Perú. Chachapoyas, Setiembre 2014. Disponible en <http://www.iiap.org.pe/Upload/Publicacion/PUBL1414.pdf>

14. May, T. Aspectos de sostenibilidad de productos no maderables forestales con uso curativo en el oeste de Pará, Brasil. *Ambiente y Desarrollo*, 20(38), 69-84. <http://dx.doi.org/10.11144/Javeriana.ayd20-38.aspm>
15. Marshall, E., Schreckenberg, K. y Newton, A.C. (Eds). *Comercialización de Productos Forestales No Maderables: Factores que Influyen en el Éxito. Conclusiones del Estudio de México y Bolivia e Implicancias Políticas para los Tomadores de Decisión*. Centro Mundial de Vigilancia de la Conservación del PNUMA, Cambridge, Reino Unido. 2006. Disponible en <https://www.odl.org/sites/odi.org.uk/files/odi-assets/publications-opinion-files/3771.pdf>
16. Sotelo, C. Domesticación participativa de árboles agroforestales en la amazonia peruana – promoviendo la conservación de recursos genéticos arbóreos y el desarrollo económico. (2000) disponible en [https://www.researchgate.net/publication/255685409\\_Domesticacion\\_participativa\\_de\\_arboles\\_agroforestales\\_en\\_la\\_amazonia\\_peruana\\_-\\_promoviendo\\_la\\_conservacion\\_de\\_recursos\\_geneticos\\_arboreos\\_y\\_el\\_desarrollo\\_economico](https://www.researchgate.net/publication/255685409_Domesticacion_participativa_de_arboles_agroforestales_en_la_amazonia_peruana_-_promoviendo_la_conservacion_de_recursos_geneticos_arboreos_y_el_desarrollo_economico)
17. Salto, C. et al. Parámetros genéticos y ganancia genética en producción de resina en *Pinus elliottii* var. *elliottii* (Engelm.) en Argentina. VI Reunión GEMFO. L, J. S.C. (eds.). (pp. 10-13). (2014). Disponible en [http://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-inta-libro\\_vi\\_gemfo.pdf](http://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-inta-libro_vi_gemfo.pdf)
18. López, J. et al. Tensiones de crecimiento, densidad básica y contracciones de la madera de clones híbridos de *Eucalyptus*. VI Reunión GEMFO. L, J. S.C. (eds.). (pp. 14-17). (2014). Disponible en [http://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-inta-libro\\_vi\\_gemfo.pdf](http://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-inta-libro_vi_gemfo.pdf)
19. Arce, R. Tendencias en la formación del profesional forestal en el Perú. *Xilema* Vol. 27, 2014. Disponible en [https://www.academia.edu/15517210/Revista\\_Xilema\\_Vol.\\_27](https://www.academia.edu/15517210/Revista_Xilema_Vol._27)

20. Galarza, E. et al. ¿Son sostenibles las concesiones forestales en el Perú? *Economía y Sociedad* 56, CIES, junio 2005. Disponible en <http://www.cies.org.pe/sites/default/files/files/otros/economiaysociedad/05-galarza.pdf>
21. Tropicos.org. Missouri Botanical Garden. 11 Oct 2016 <http://www.tropicos.org>
22. Newman, M. Instituto de Biología. Universidad Nacional Autónoma de México. *Flora Del Valle De Tehuacán-Cuicatlán*. Fascículo 51. CAPPARACEAE Juss. (2007). Disponible en [http://www.ibiologia.unam.mx/barra/publicaciones/floras\\_tehuacan/F51\\_Capp.pdf](http://www.ibiologia.unam.mx/barra/publicaciones/floras_tehuacan/F51_Capp.pdf)
23. Santa Cruz, L.; 2011. *Flora de espermatofitas del distrito de Pulán, Santa Cruz, Cajamarca*. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Tesis para optar el grado de Magister en Botánica tropical con mención en Taxonomía y Sistemática Evolutiva, Lima.
24. Cornejo, X. & Iltis, H. A revision of *Colicodendron* (Capparaceae). *J. Bot. Res. Inst. Texas* 2(1): 75 – 93. (2008). Recuperado en [http://www.jstor.org/stable/41971978?seq=1#page\\_scan\\_tab\\_contents](http://www.jstor.org/stable/41971978?seq=1#page_scan_tab_contents)
25. Inocencio, C. et al. The use of floral characters in *Capparis* sect. *Capparis* to determine the botanical and geographical origin of capers. *Eur Food Res Technol* (2002) 214:335–339. DOI 10.1007/s00217-001-0465-y. 2002. Disponible en [https://www.researchgate.net/publication/225119745\\_The\\_use\\_of\\_floral\\_characters\\_in\\_Capparis\\_sect\\_Capparis\\_to\\_determine\\_the\\_botanical\\_and\\_geographical\\_origin\\_of\\_capers](https://www.researchgate.net/publication/225119745_The_use_of_floral_characters_in_Capparis_sect_Capparis_to_determine_the_botanical_and_geographical_origin_of_capers)
26. Cornejo, X. & Iltis, H. *Hispaniolanthus*: a new genus of Capparaceae endemic to Hispaniola. *Harvard Papers in Botany*, Vol. 14, No. 1, pp. 9–14. 2009. Doi: 10.3100/025.014.0103.

27. Monsalve, C. El libro rojo de las plantas endémicas del Perú. Rev. Peru. Biol. Número especial 13(2): 242s- 243s. Ed.: Blanca León et al. Facultad de Ciencias Biológicas UNMSM. Versión online ISSN 1727-9933. (Diciembre 2006). Recuperado de <http://www.scielo.org.pe/pdf/rpb/v13n2/v13n02a030.pdf>
28. MINAM. Mapa del Patrimonio Forestal Nacional. disponible en <http://cdam.minam.gob.pe/novedades/mapapatrimonioforestal.pdf>
29. MINAM. V Informe Nacional Sobre la Aplicación del Convenio sobre la Diversidad Biológica: PERÚ (2010-2013). Disponible en <http://www.minam.gob.pe/diversidadbiologica/wp-content/uploads/sites/21/2013/10/V-Informe.pdf>
30. Medina, P. Informe De Los Impactos Ambientales En La Zona de Recuperación Del Santuario Histórico Bosque De Pomac. (2010). Recuperado de [http://www.tfcaperu.org/SHBP\\_informe\\_impactos\\_ambientales.pdf](http://www.tfcaperu.org/SHBP_informe_impactos_ambientales.pdf)
31. Moutarde, Fanny. Los carbones hablan: un estudio del material antracológico de la plataforma Uhle, huaca de la luna. un acercamiento a la economía vegetal de la costa norte del Perú en la época mochica. Arqueología mochica nuevos enfoques. (2008). Recuperado de [http://sanjosedemoro.pucp.edu.pe/descargas/arqueologia\\_mochica/01mochica\\_enfoques.pdf](http://sanjosedemoro.pucp.edu.pe/descargas/arqueologia_mochica/01mochica_enfoques.pdf)
32. Camacho, M. Caracterización estructural de metabolitos secundarios de Capparis ovalifolia. pontificia universidad católica del Perú. facultad de ciencias e ingeniería. (2012). Disponible en [http://tesis.pucp.edu.pe/repositorio/bitstream/handle/123456789/1461/CAMACHO\\_HUERTA\\_MADELAINE\\_METABOLITOS\\_CAPPORIS\\_OVALIFOLIA.pdf;jsessionid=506E2732FDE655826F3B0AFC38C6B627?sequence=1](http://tesis.pucp.edu.pe/repositorio/bitstream/handle/123456789/1461/CAMACHO_HUERTA_MADELAINE_METABOLITOS_CAPPORIS_OVALIFOLIA.pdf;jsessionid=506E2732FDE655826F3B0AFC38C6B627?sequence=1)
33. Zorogastúa, P. Evaluación de cambios en la cobertura y uso de la tierra con imágenes de satélite en Piura-Perú. Ecología Aplicada, vol. 10, núm. 1, enero-

agosto, 2011, pp. 13-22. Recuperada de  
<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=34122069002>

34. Romo, M. et al. Escasa presencia y grave amenaza para el “cortarramas peruano”, *Phytotoma raimondii*. Revista peruana de biología 22(2): 213 - 224 (2015). doi: <http://dx.doi.org/10.15381/rpb.v22i2.11355>
35. Informe de los impactos ambientales en la zona de recuperación del santuario histórico bosque de Pómac. Proyecto: “Gestión participativa para la conservación y el desarrollo sostenible de los bosques secos del Santuario Histórico Bosque de Pomac (SHBP) y su Zona de Amortiguamiento (ZA) - II FASE”. (2010). Disponible en [http://www.tfcaperu.org/SHBP\\_informe\\_impactos\\_ambientales.pdf](http://www.tfcaperu.org/SHBP_informe_impactos_ambientales.pdf)
36. Dirección de Desarrollo del Producto Turístico - DNDT/VMT/MINCETUR. 2006. Disponible en [http://bvpad.indecigob.pe/doc/estudios\\_CS/Region\\_lambayeque/lambayeque/lambayeque\\_mp.pdf](http://bvpad.indecigob.pe/doc/estudios_CS/Region_lambayeque/lambayeque/lambayeque_mp.pdf)
37. Plan estratégico provincial de turismo. Ministerio de comercio exterior y turismo. 2015. Disponible en [http://www.mincetur.gob.pe/turismo/Producto\\_turistico/Fit/fit/Planes/Lambayeque/LAMBAYEQUE.pdf](http://www.mincetur.gob.pe/turismo/Producto_turistico/Fit/fit/Planes/Lambayeque/LAMBAYEQUE.pdf)
38. Análisis situacional de salud. Diresa Lambayeque oficina de epidemiología análisis de la situación de salud Lambayeque Perfil Socio-Demográfico, de Morbilidad y Mortalidad, Prioridades y Respuesta Social. 2012.
39. Instituto nacional de defensa civil INDECI–PNUD – per/02/051. Ciudades sostenibles. Mapa de peligros de la ciudad de Ferreñafe. Diciembre 2003.
40. López SJ, Nieto AR, Barrietos-Priego AF, Rodríguez PE, Colinas-León MT, Borys MW, et al. Selección de variables morfológicas para la caracterización del tejocote (*Crataegus* spp). Revista Chapingo Serie Horticultura 2008; 14(2): 97-111.

41. Arias, Y. Variabilidad Genética entre Genotipos Promisorios de Tomate (*Solanum lycopersicum*) Obtenidos en Programas de Mejoramiento Frente al TYLCV. Rev. Protección Veg. Vol. 25 No. 3 (2010): 190-193. Disponible en <http://scielo.sld.cu/pdf/rpv/v25n3/rpv07310.pdf>
42. Blas, R. Certificación de semillas y mejoramiento genético de plantas mediante marcadores moleculares. Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima-Peru. Instituto de Biotecnología (IBT). (2010).
43. Vos, P. et al. AFLP: A new technique for DNA Fingerprinting. Nucleic Acids Reserch 23:4407-4414. 1995. Disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC307397/pdf/nar00021-0189.pdf>
44. Paran, I., E, Aftergoot y Ch. Shifriss Variation in Capsicum annum revelated by RAPD and AFLP markers. Euphytica 99: 167-173. (1998).Disponible en <http://www.ajol.info/index.php/ajb/article/download/62388/50360>
45. Núñez, E. Análisis de la variabilidad genética de las ocas cultivadas (*Oxalis tuberosa* Mol.) de la región Cajamarca. Tesis doctoral no disertada. 2015.
46. Piñero, D., et al. La variabilidad genética de las especies: aspectos conceptuales y sus aplicaciones y perspectivas en México, en Capital natural de México, vol. I: Conocimiento actual de la biodiversidad. Conabio, México, pp. 415-435. 2008.
47. Caracterización morfológica y molecular de nueve variedades botánicas de *Tigridia pavonia*. Disponible en [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1405-31952010000200003](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-31952010000200003)
48. Rohlf, F. 2001. NTSYS-pc. Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, version 2.01. Exeter Software, Setauket, New York.

49. Doyle, J.J. and Doyle, J.L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12:13–15.
50. Bassam, B; Caetano-Anolles, G; Gresshoff, G. 1991. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem*, 196: 80-83.
51. Sokal, R; Michener, C. A statistical method for evaluating systematic relationships. *University Kansas Scientific Bulletin* 38: 1409-1438. 1958. Disponible en [https://archive.org/details/cbarchive\\_33927\\_astatisticalmethodforevaluatin1902](https://archive.org/details/cbarchive_33927_astatisticalmethodforevaluatin1902)
52. Hildebrand C.E., Torney D.C., and Wagner R.P. 1992. Informativeness of Polymorphic DNA Markers. *Los Alamos Science* 20, 100-102.
53. Excoffier, L. and H.E. L. Lischer. 2010. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol. Eco. Res.* 10: 564-567.
54. Excoffier, L., Smouse, P. and Quattro, J. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131:479- 491.
55. BORAZAN, A.; BABAC, M. T. 2003. Morphometric leaf variation in oaks (*Quercus*) of Bolu, Turkey. *Annales Botanici Fennici* 40:233-242.
56. Hampe, A., y Petit, R.J., 2005. Conserving biodiversity under climate change: the rear edge matters. *Ecology Letters* 8: 461-467.
57. O'MALLEY, D. Y WHETTEN, R. 1997. Molecular markers and forest trees. En: *DNA markers: Protocols, Applications and Overviews*, ed by Caetano, G. y Gresshoff. John Wiley & Sons. New York.

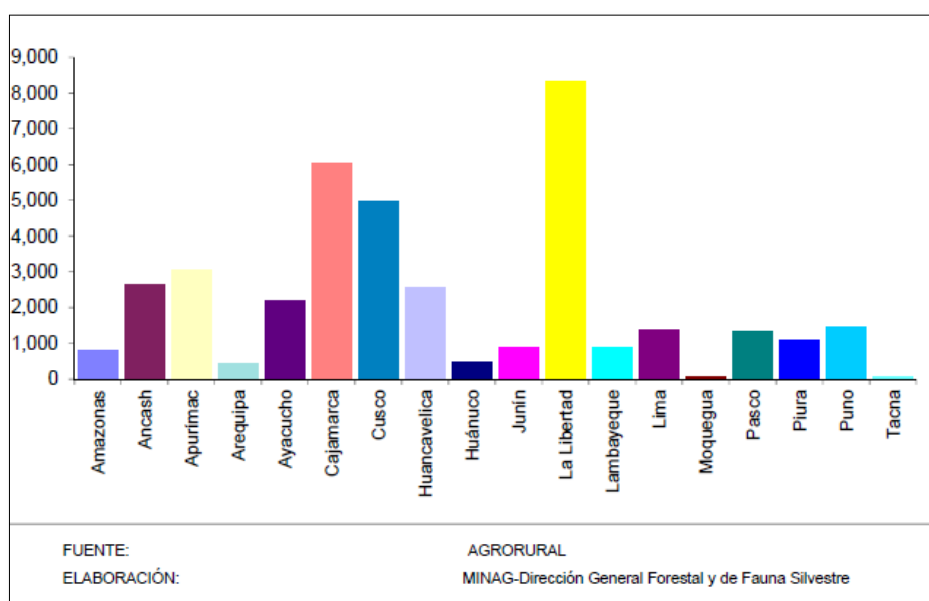


## X. ANEXOS

### Anexo 1 Especies forestales en la finca casa de tabla en Cuba

Especies	Familia
<i>Laurocerasus occidentalis</i>	Amygdalaceae
<i>Oxandra lanceolata</i>	Annonaceae
<i>Cordia colococa</i>	Boraginaceae
<i>Gescanthus gerascantoides</i>	Boraginaceae
<i>Poeppigia procera</i>	Caesalpinaceae
<i>Cecropia peltata</i>	Cecropiaceae
<i>Calophyllum antillanum</i>	Clusiaceae
<i>Andira inermis</i>	Fabaceae
<i>Cinnamomum cubense</i>	Lauraceae
<i>Nectandra coriacea</i>	Lauraceae
<i>Licaria jamaicensis</i>	Lauraceae
<i>Hibiscus elatus</i>	Malvaceae
<i>Swietenia mahagoni</i>	Meliaceae
<i>Cedrela odorata</i>	Meliaceae
<i>Trichilia hirta</i>	Meliaceae
<i>Guarea guara</i>	Meliaceae
<i>Samanea saman</i>	Mimosaceae
<i>Lysiloma sabicu</i>	Mimosaceae
<i>Pseudolmedia spuria</i>	Moraceae
<i>Genipa americana</i>	Rubiaceae
<i>Dipholis salicifolia</i>	Sapotaceae
<i>Luehea speciosa</i>	Tiliaceae

### Anexo 2 Instalaciones de plantaciones forestales al año 2011.



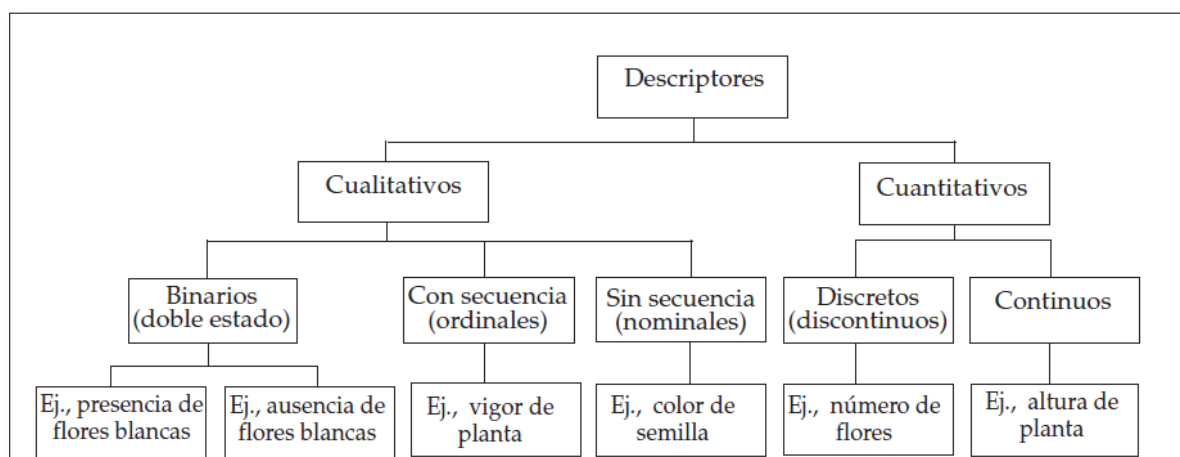
### Anexo 3 Aspectos destacados de las comunidades estudiadas de México y Bolivia y las cadenas de valor de los productos.

Nombre de la comunidad	Nombre de las especies	Parte usada y cadena de valor	Meses comercializados en el año	Evidencia de domesticación	Grado de transformación dentro de la comunidad	Consumidor final	Dominio de los individuos en la cadena de valor	Tendencia de la demanda nacional en los últimos diez años.
Santa Rosa de Challana. La Paz, Bolivia	<i>Hevea brasiliensis</i> goma natural	Tronco cortado para extraer el látex y la goma de látex procesada	11,3	NO	Alto	Mineros locales	No	Baja
Tomachi La Paz, Bolivia	<i>Hevea brasiliensis</i> goma natural	Tronco cortado para extraer el látex y la goma de látex comercializada	6,3	NO	Bajo	Nacional	Dominada por concesionarios en La Paz	Baja
Pucasucho La Paz, Bolivia	<i>Clusia</i> y <i>Protium</i> sp incienso/copal	Tronco cortado para extraer resina e incienso/copal comercializado	12	NO	Ninguno	Copal para México e incienso para la Argentina	Dominado por un oligopolio	Estable
Carmen Surutú Santa Cruz, Bolivia	<i>Carludovica palmata</i> palma jipijapa	hojas elaboradas y trenzadas en sombreros de jipijapa	10	SI	Alto	Local	No	Alza
Candelaria Santa Cruz, Bolivia	<i>Carludovica palmata</i> palma jipijapa	hojas procesadas y trenzadas en artesanías de jipijapa para turistas	11,5	SI	Alto	Nacional e internacional a través de los turistas	Emprendedor	Alza
Potrero San Rafael Santa Cruz, Bolivia	<i>Carludovica palmata</i> palma jipijapa	hojas elaboradas y trenzadas en artesanías de jipijapa para turistas	11,5	SI	Alto	Nacional e internacional a través de los turistas	Emprendedor	Alza
Santa Marta Latuvi Oaxaca, México	<i>Tricholoma magnivelare</i>	cuerpo fructífero recolectado y exportado en fresco	2	No	Ninguno	Internacional (Japón)	Emprendedor	Alza
San Antonio Cuajimoloyas Oaxaca México	<i>Amanita caesarea</i> <i>Cantharellus cibarius</i> <i>Boletus edulis</i>	cuerpo fructífero recolectado y vendido en fresco para consumo local	2	No	Ninguno	Local	Usos para comerciantes locales	Alza
San Antonio Cuajimoloyas Oaxaca México	<i>Amanita caesarea</i> <i>Cantharellus cibarius</i> <i>Boletus edulis</i>	cuerpo fructífero recolectado y vendido en fresco para comercialización regional y nacional	2	No	Alto	Nacional	Empresa comunitaria	Alza
Arroyo Blanco Oaxaca, México	<i>Aechmea magdalenae</i> pita	Fibra extraída de las hojas, lavadas y peinadas en fibra de pita vendida para hacer hilo	2	SI	Alto	Nacional e internacional (América del Norte)	presidente de la asociación local de productores	Bajo

**Anexo 4 Planta de herbario de *Colicodendron scabridum* Seem (*Capparis scabrida* Kunth)**



## Anexo 5 Tipos de descriptores



## Anexo 6 Lugares de distribución del sapote

Unidades Forestales	Área (Ha.)	%	Localización	Especies Representativas
Bosque seco ralo de llanura	243,712	55	En suelos de origen aluvial hasta los inicios del flanco occidental de la cordillera. (Norte de la provincia de Lambayeque: Vega del Padre, Insulas y Vingar; en la parte media del río Salas, Apurlec y Humedades.	Arbustos como zapote, algarrobo y faique. Arbustivas como overo, bichayo y gigantón (Neoraimon dia gigantea). Las plantas herbáceas: flor blanca. Gramíneos: cadillo forrajero, cordoncillo y rabo de zorro. Cucurbitáceas: yuca de monte, entre otras.
Bosque seco de colina	155,869	35	En las vertientes de la cordillera occidental, en Ñaupe, Olmos, cerro Chalpón, Tongorape y Chochope. También en la parte media de la cuenca de la Leche (Mayascon)	Árbóreas: palo santo, hualtaco, capote, pasallo, palo blanco, palo verde y aroma. Arbustivas: overo, borachera. Cactáceas: gigantón y el cardo.
Bosque seco tipo sábana	42,400	10	Al norte de la ciudad de Olmos, sectores las Pampas y Boca Chica, al sur de Salas en Humedades y la Peña.	Árbóreas: Algarrobo, zapote y faique. Arbustivas: overo, bichayo y Cancún. Cactáceas: condoncillo y cadillo.
<b>TOTAL</b>	<b>441881</b>	<b>100</b>		

Fuente: Mapa de Inventario forestal de los bosques secos de Lambayeque, Proyecto Algarrobo – INRENA, 2000.

## Anexo 7 Coordenadas de cada individuo analizado

Muestras	Latitud sur	Longitud oeste	Altitud
PITIPO01	6° 28' 56"	79° 44' 10"	81
PITIPO02	6° 28' 48"	79° 44' 10"	82
PITIPO03	6° 28' 48"	79° 44' 11"	81
PITIPO04	6° 28' 49"	79° 44' 10"	83
PITIPO05	6° 28' 49"	79° 44' 10"	84
PITIPO06	6° 28' 50"	79° 44' 10"	83
PITIPO07	6° 28' 48"	79° 44' 11"	83
PITIPO08	6° 28' 49"	79° 44' 11"	84
PITIPO09	6° 28' 53"	79° 44' 10"	82
PITIPO10	6° 28' 56"	79° 44' 10"	81
PITIPO11	6° 28' 56"	79° 44' 9"	81
PITIPO12	6° 28' 56"	79° 44' 8"	82
PITIPO13	6° 28' 56"	79° 44' 8"	83
PITIPO14	6° 28' 58"	79° 44' 8"	81
PITIPO15	6° 28' 59"	79° 44' 8"	78
PITIPO16	6° 29' 1"	79° 44' 8"	80
PITIPO17	6° 29' 4"	79° 44' 8"	79
PITIPO18	6° 29' 8"	79° 44' 8"	82
SALAS19	6° 16' 25"	79° 35' 32"	253
SALAS20	6° 16' 24"	79° 35' 32"	244
SALAS21	6° 16' 28"	79° 35' 36"	224
SALAS22	6° 16' 29"	79° 35' 40"	215

Muestras	Latitud sur	Longitud oeste	Altitud
SALAS24	6° 16' 32"	79° 35' 48"	204
NUEVA ARICA25	6° 52' 38"	79° 19' 10"	224
NUEVA ARICA26	6° 52' 39"	79° 19' 11"	225
NUEVA ARICA27	6° 52' 40"	79° 19' 12"	225
NUEVA ARICA28	6° 52' 41"	79° 19' 14"	229
NUEVA ARICA29	6° 52' 41"	79° 19' 15"	228
NUEVA ARICA30	6° 52' 40"	79° 19' 15"	226
NUEVA ARICA31	6° 52' 42"	79° 19' 16"	231
NUEVA ARICA32	6° 52' 41"	79° 19' 16"	230
NUEVA ARICA33	6° 52' 40"	79° 19' 17"	234
NUEVA ARICA34	6° 52' 39"	79° 19' 15"	236
NUEVA ARICA35	6° 52' 39"	79° 19' 15"	236
NUEVA ARICA36	6° 52' 38"	79° 19' 17"	234
NUEVA ARICA37	6° 52' 38"	79° 19' 17"	232
NUEVA ARICA38	6° 52' 41"	79° 19' 20"	239
NUEVA ARICA39	6° 52' 41"	79° 19' 18"	233
NUEVA ARICA40	6° 52' 44"	79° 19' 10"	236
ZAÑA41	6° 55' 59"	79° 37' 20"	75
ZAÑA42	6° 55' 60"	79° 37' 23"	81
ZAÑA43	6° 55' 60"	79° 37' 24"	81
ZAÑA45	6° 55' 60"	79° 37' 25"	82

ZAÑA46	6° 56' 3"	79° 37' 24"	76
ZAÑA47	6° 56' 6"	79° 37' 24"	76
ZAÑA48	6° 56' 2"	79° 37' 22"	75
ZAÑA49	6° 56' 5"	79° 37' 21"	74
ZAÑA50	6° 56' 6"	79° 37' 20"	70
OLMOS51	6° 0' 36"	79° 41' 27"	372
OLMOS52	6° 0' 41"	79° 41' 28"	364
OLMOS53	6° 0' 41"	79° 41' 29"	362
OLMOS54	6° 0' 45"	79° 41' 32"	344
OLMOS55	6° 0' 45"	79° 41' 29"	335
OLMOS56	6° 0' 46"	79° 41' 28"	335
OLMOS57	6° 0' 48"	79° 41' 29"	334
OLMOS58	6° 0' 49"	79° 41' 28"	326
OLMOS59	6° 0' 50"	79° 41' 28"	325
OLMOS60	6° 0' 52"	79° 41' 28"	320
OLMOS61	6° 0' 52"	79° 41' 29"	315
OLMOS62	6° 0' 54"	79° 41' 32"	310
OLMOS63	6° 0' 55"	79° 41' 31"	307
OLMOS65	6° 0' 55"	79° 41' 27"	311
OLMOS66	6° 0' 55"	79° 41' 23"	305
OLMOS67	6° 0' 55"	79° 41' 21"	289

REQUE68	6° 49' 8"	79° 44' 36"	56
REQUE69	6° 49' 9"	79° 44' 36"	56
REQUE70	6° 49' 10"	79° 44' 36"	57
REQUE71	6° 49' 10"	79° 44' 36"	51
REQUE72	6° 49' 11"	79° 44' 36"	49
REQUE73	6° 49' 12"	79° 44' 36"	57
REQUE74	6° 49' 12"	79° 44' 36"	58
REQUE75	6° 49' 12"	79° 44' 36"	55
REQUE76	6° 49' 13"	79° 44' 36"	54
REQUE77	6° 49' 13"	79° 44' 36"	52
REQUE78	6° 49' 14"	79° 44' 36"	54
REQUE79	6° 49' 15"	79° 44' 36"	58
REQUE80	6° 49' 17"	79° 44' 36"	58
REQUE81	6° 49' 20"	79° 44' 36"	62



## **ANEXO 8. Protocolo de extracción de ADN: Método CTAB de Doyle & Doyle con algunas modificaciones.**

1. Pulverizar con nitrógeno líquido el tejido foliar colectado de preferencia de hojas jóvenes aproximadamente 100 mg.
2. En un tubo Eppendorf de 1,5 ml colocar material vegetal pulverizado hasta la marca de 500  $\mu$ L y resuspender con 700  $\mu$ L de buffer CTAB (2X), Adicionando 2  $\mu$ L de  $\beta$  mercaptoetanol. Agitar suavemente y llevar a baño María por 40 minutos a 65 °C.
3. Retirar del Baño María y dejar reposar por espacio de 2 minutos a temperatura ambiente.
4. Agregar 700  $\mu$ L cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) mezclar suavemente el tubo y centrifugar 5 min a 14 000 rpm. Transferir el sobrenadante a otro tubo.
5. Adicionar 50  $\mu$ L de CTAB (10X), mezclar suavemente para homogenizar todo el líquido.
6. Adicionar 700  $\mu$ L de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), mezclar suavemente y centrifugar 5 min a 14 000 rpm. Transferir el sobrenadante a otro tubo.
7. Agregar  $\frac{3}{4}$  partes del volumen final (500  $\mu$ L aprox.) de Isopropanol helado para precipitar el ADN. Incubar a -20 °C durante 40 min.
8. Centrifugar 20 min a 12 000 rpm y descartar el sobrenadante cuidando de no perder el pellet.
9. Lavar el pellet con 500  $\mu$ L de Etanol al 70% helado y centrifugar 20 min a 12 000 rpm descartar el Etanol.
10. Lavar el pellet con 500  $\mu$ L de Etanol al 95% helado y centrifugar 20 min a 12 000 rpm descartar el Etanol.
11. Permitir que el ADN (pellet) se seque al aire libre por toda la noche y luego resuspender el ADN en 80  $\mu$ L de agua MQ y almacenar a -20 °C.
12. Finalmente agregar 1  $\mu$ L de RNase diluida, agitar suavemente e incubar las muestras a 37°C por 20 minutos.

## **ANEXO 9. Análisis de Calidad y Cuantificación de ADN**

La calidad se determinó en un espectrofotómetro así se obtuvieron individuos con una cantidad adecuada, entre 1,6 y 1.8. Pero también otros individuos presentaron contaminación determinada por valores debajo de 1,6 y por encima de 1,8, volviendo a hacer diluciones para su limpieza total.

Posteriormente se realizó la calidad del Dna, para eso se realizó una electroforesis horizontal con 6 individuos de cada población, tomando 2 ul de la muestra de Dna y 8 ul del colorante SALB 1X, el gel de agarosa se hizo en un porcentaje del 0,5%, se cargó en el gel un marcador de peso molecular conocido ( ADN fago lambda( $\lambda$ ) cortado con la enzima Pst1) (14,000pb); posteriormente la corrida electroforética se realiza a 90 voltios por 60 minutos utilizando como Tampón de corrida TBE 1X, determinando la calidad del Dna por medio de la interacción del bromuro de etidio al intercalarse con las bandas de Dna y su posterior visualización en un transluminador.

## ANEXO 10. Tamizado con 16 primers

N°	Iniciador	Secuencia	Iniciador	Secuencia
1	E38	5-GACTGCGTACCAATTC  ACT-3	M59	GATGAGTCCTGAGTAA  CTA-3
2	E37	5-GACTGCGTACCAATTC  ACG-3	M48	GATGAGTCCTGAGTAA  CAC-3
3	E40	5-GACTGCGTACCAATTC  ACG-3	M35	GATGAGTCCTGAGTAA  ACA-3
4	E44	5-GACTGCGTACCAATTC  ATC-3	M31	GATGAGTCCTGAGTAA  AAA-3
5	E41	5-GACTGCGTACCAATTC  AGG-3	M59	GATGAGTCCTGAGTAA  CTA-3
6	E37	5-GACTGCGTACCAATTC  ACG-3	M50	GATGAGTCCTGAGTAA  CAT-3
7	E45	5-GACTGCGTACCAATTC  ATG-3	M53	GATGAGTCCTGAGTAA  CCG-3
8	E33	5-GACTGCGTACCAATTC  AAG-3	M49	GATGAGTCCTGAGTAA  CAG-3
9	E12	5-GACTGCGTACCAATTC  AC-3	M55	GATGAGTCCTGAGTAA  CGA-3
10	E41	5-GACTGCGTACCAATTC  AGG-3	M32	GATGAGTCCTGAGTAA  AAC-3
11	E35	5-GACTGCGTACCAATTC  ACA-3	M48	GATGAGTCCTGAGTAA  CAC-3
12	E44	5-GACTGCGTACCAATTC  ATC-3	M48	GATGAGTCCTGAGTAA  CAC-3
13	E32	5-GACTGCGTACCAATTC  AAC-3	M47	GATGAGTCCTGAGTAA  CAA-3
14	E32	5-GACTGCGTACCAATTC  AAC-3	M31	GATGAGTCCTGAGTAA  AAA-3
15	E12	5-GACTGCGTACCAATTC  AC-3	M48	GATGAGTCCTGAGTAA  CAC-3
16	E37	5-GACTGCGTACCAATTC  ACG-3	M32	GATGAGTCCTGAGTAA  AAC-3

## **ANEXO 11. Preparación de geles de poliacrilamida**

### **1. Preparación de la placa pequeña de vidrio (Zona donde se adhiere el gel)**

- a. Limpiar muy bien la placa de vidrio con alcohol. Dejar secar.
- b. En un tubo de microcentrífuga, prepara la solución de adhesión mezclando 15  $\mu$ l de Bind Silane y 15  $\mu$ l ácido acético glacial concentrado en 1.5 ml de alcohol al 95%. Dejar una leve agitación a la mezcla.
- c. Esparcir la solución de adhesión sobre toda la placa de vidrio con la ayuda de un papel tissue o papel Kim Wipes.
- d. Dejar secar a temperatura ambiente por 30 min.
- e. Después de transcurrido el tiempo remover las partículas de polvo usando el mismo tipo de papel. Esta limpieza debe ser hecha en una dirección perpendicular, aplicando una ligera presión. Mucha presión podría remover el Bind Silane y el gel podría no adherirse.

### **2. Preparación de placa grande de vidrio (Zona donde no se adhiere el gel)**

- a. Limpiar muy bien la placa de vidrio con alcohol. Dejar secar.
- b. Usando un papel tissue o papel KimWipes humedecido con Repel Silane (Sigma), solución que evita que el gel se adhiera al vidrio, esparcir completamente sobre toda la placa.
- c. Dejar secar a temperatura ambiente por 5 min.
- d. Momentos antes de iniciar el ensamblaje de los vidrios, remover las partículas de polvo usando el mismo tipo de papel. Esta limpieza debe ser hecha en una dirección perpendicular, aplicando una ligera presión. Mucha presión podría remover el Bind Silane y el gel podría no adherirse.

### **3. Ensamblaje y preparación del gel (poliacrilamida 6%; 7M urea)**

Para el ensamblaje del sistema se siguen estos pasos:

- a. Colocar los espaciadores laterales sobre la placa grande de vidrio (lado tratado).  
Sobre ella colocar la placa pequeña de vidrio de manera que los lados tratados estén frente a frente.
- b. Entre las dos placas de vidrios se coloca el espaciador inferior.
- c. Asegurar las esquinas y los puntos medios del sistema con abrazaderas metálicas que ejerzan igual presión en ambos lados
- d. Probar los peines adecuados (de grosor preciso) en la parte superior del sistema.
- e. Tomar un volumen de 60ml de solución de poliacrilamida, adicionar 40  $\mu$ l de TEMED y 450 $\mu$ l de Persulfato de amonio al 10%, agitar suavemente, verter la solución a la placa de gel ensamblada, por una esquina, de manera continua para evitar la formación de burbujas.

### **4. Pre corrida y cargado del gel de poliacrilamida**

Al cabo del tiempo esperado retirar los peines lavar los residuos de acrilamida en el gel formado llevar a la cámara electroforética; con ayuda de una jeringa hipodérmica retirar las burbujas de la parte superior e inferior del gel y pre correr a un voltaje 1600 voltios por espacio de 20 minutos.

En este tiempo se aprovecha para adicionar los 5  $\mu$ L de DYE a las muestras y llevarlas a denaturar por 5 minutos. Una vez precorrido el gel colocar los peines y cargar las muestras ya denaturadas.

### **Anexo 12. Tinción y revelado de los geles de poliacrilamida.**

1. Se efectúa la fijación con 5ml de ácido acético, 100ml de alcohol puro y 900ml de agua destilada, se mezclan bien todos los componentes y se deja reposar por 20 minutos.
2. Posteriormente a la fijación, se realiza la tinción con nitrato de plata (2gr + 1000ml de agua destilada).
3. Luego el revelado para observar las bandas de dna, se mezcla 30gr de hidróxido de sodio con 800ml de agua destilada y 5 a 6ml de formaldehído.
4. Se finaliza añadiendo al vidrio una solución de fijación y posteriormente se enjuaga con agua destilada y se deja secar al ambiente o en una estufa, para así poder escanear y empezar a analizar las bandas de ADN.

### Anexo 13. Imágenes de la variabilidad de los individuos respecto a los descriptores.



1. imágenes de la variabilidad del primer descriptor. A la izquierda se presenta un árbol, la parte media un arbusto y en la parte derecha una mata postrada.



2. Imágenes de la variabilidad del segundo descriptor. A la izquierda hojas oblongas, centro, hojas ovadas, derecha, hojas lanceoladas.



3. Imágenes de la variabilidad del tercer descriptor. A la derecha base redondeada y a la izquierda base obtusa.





4. Imágenes de la variabilidad del cuarto descriptor. A la derecha se muestra un ápice obtuso y a la izquierda un ápice agudo.



5. Imágenes de la variabilidad del quinto descriptor. A la derecha se muestra hojas opuestas, en el centro a la derecha se muestran hojas subopuestas, en el centro hojas subopuestas y alternas, en el centro a la izquierda hojas alternas, a la izquierda hojas alternas y opuestas.



6. Imágenes de la variabilidad del sexto descriptor. A la derecha hojas pilosas y a la izquierda hojas muy pilosas.



7. Imágenes del séptimo descriptor. En la parte superior izquierda está la imagen del fruto globoso, en la parte central derecha está el fruto redondo, en la parte central izquierda, fruto oblongo, en la parte superior izquierda está el fruto ovoide, en la parte inferior derecho está el fruto alargado y en la parte inferior derecha se encuentra el fruto arriñonado.