

Artículo Original

Diversidad genética de *Dioscorea trifida* "sachapapa" de cinco cuencas hidrográficas de la amazonía peruana

[Genetic diversity of *Dioscorea trifida* "sachapapa" from five river basins of Peruvian Amazon]

Jhonatan Pérez-Arévalo, Roberson Ramírez-Saavedra, Pedro M. Adrianzen-Julca,
Marianela Cobos-Ruiz & Juan C. Castro-Gómez*

Unidad Especializada de Biotecnología (UEB), Centro de Investigaciones de Recursos Naturales de la Amazonía (CIRNA),
Universidad Nacional de la Amazonía Peruana (UNAP). Psje. Los Paujiles S/N AAHH Nuevo San Lorenzo, San Juan
Bautista, Iquitos-Perú.

*e-mail: juanccgomez@yahoo.es

Resumen

Dioscorea trifida "sachapapa" es una de las especies promisorias amazónicas que podemos considerarla huérfana de la ciencia, por las escasas investigaciones que hay sobre esta especie. El objetivo de esta investigación fue determinar la diversidad genética intra e interpoblacional de *D. trifida* de cinco cuencas hidrográficas de la amazonía peruana. Las hojas fueron colectadas de una colección de germoplasma y purificó el ADN con métodos estándares. El polimorfismo genético se evaluó con la técnica RAPD y los parámetros de genética poblacional fueron estimados con el programa POPGENE. Los análisis espectrofotométrico ($A_{260}/A_{280}=1,7\pm0,1$) y electroforético (bandas de ADN íntegras) mostraron que el ADN purificado fue de alta calidad. Asimismo, la cantidad obtenida fue apropiada para estudios de diversidad genética (rendimiento promedio = 582 ± 248 µg ADN/mg hojas). La diversidad genética intrapoblacional más alta se encontró en la cuenca del Itaya ($h = 0,24\pm0,11$) y la más baja en la cuenca del Marañón ($h = 0,10\pm0,04$). Adicionalmente, la diversidad genética interpoblacional más alta se registró entre las poblaciones de Itaya vs Ucayali ($G_{ST} = 1,00$), mientras que la más baja entre las poblaciones de Nanay vs Tapiche ($G_{ST} = 0,07$). En conclusión, *D. trifida* muestra variación en su diversidad genética intra e interpoblacional en las cinco cuencas hidrográficas de la amazonía peruana, siendo la cuenca del Itaya la que presenta mayor diversidad genética intrapoblacional y las poblaciones de Itaya vs Ucayali las que presentan mayor diversidad genética interpoblacional, que en parte se atribuyen al flujo de genes diferencial entre las poblaciones analizadas.

Palabras claves: Genética poblacional, polimorfismo genético, RAPD, tubérculo amazónico.

Abstract

Dioscorea trifida "sachapapa" is a promising Amazonian species that we consider an orphan of science, because there is limited research on this species. The objective of this research was to determine the intra and interpopulational genetic diversity of *D. trifida* from five river basins of the Peruvian Amazon. Leaves were collected from a germplasm collection and DNA was purified with a standardized methods. The genetic polymorphism was assessed by RAPD technique and population genetics parameters estimated with POPGENE software. Spectrophotometric ($A_{260}/A_{280} = 1.7 \pm 0.1$) and electrophoretic analysis (intact DNA bands) showed the high quality of purified DNA. Likewise, the amount obtained was suitable for studies of genetic diversity (average yield = 582 ± 248 µg DNA/mg leaves). High intragenetic population diversity was found in Itaya basin ($h = 0.24 \pm 0.11$), and lowest in Marañón basin ($h = 0.10 \pm 0.04$). Additionally, the Itaya vs Ucayali populations showed high intergenetic population diversity ($G_{ST} = 1.00$), while Nanay vs Tapiche populations showed the lowest value ($G_{ST} = 0.07$). In conclusion, *D. trifida* shows variation in intra and inter-population genetic diversity in five river basins in the Peruvian Amazon, being Itaya basin which has high intragenetic diversity, and Itaya vs Ucayali populations showed high interpopulation genetic diversity, which in part is attributed to differential gene flow among analyzed populations.

Keywords: populational genetic, genetic polymorphism, RAPD, Amazonian tuber.

Recibido: 20 setiembre 2013

Aceptado: 12 noviembre 2013

Este artículo puede ser citado como J Pérez-Arévalo, R Ramírez-Saavedra, PM Adrianzen-Julca, M Cobos-Ruiz & JC Castro-Gómez. 2013. Diversidad genética de *Dioscorea trifida* "sachapapa" de cinco cuencas hidrográficas de la amazonía peruana. **Cienc amaz (Iquitos)** 3(2), 74-83.

INTRODUCCIÓN

La amazonia peruana es una de las regiones más ricas en diversidad biológica, entendida esta como la riqueza de ecosistemas y de recursos genéticos expresada en especies de fauna y flora (Villarejo 2005). Esta última se caracteriza por ser abundante y diversa, de tal modo que tenemos, entre angiospermas y gimnospermas, aproximadamente 6237 especies que representan el 36,3% de la flora fanerógama del Perú. Dentro de este grupo diverso de especies, se han identificado 42 especies y 2 variedades de la familia Dioscoreaceae (Vásquez y Rojas 2002). Las especies de esta familia son empleadas para múltiples propósitos. Los tubérculos de esta familia constituyen un alimento básico para más de 100 millones de personas en los trópicos húmedos y sub húmedos. Asimismo, en la selva alta y baja de nuestra amazonia *Dioscorea trifida* L.f. "sachapapa", constituye una fuente de primer nivel en la dieta de los pobladores nativos, colonos y urbanos (Montaldo 1991). Adicionalmente, las especies de este género, tienen importancia farmacológica por el alto contenido de diosgenina, el cual es empleado como precursor en la síntesis química de cortisonas (Heble y Staba 1980).

A pesar de la importancia alimenticia y farmacológica de *D. trifida* los estudios de esta especie son escasos. Así, son pocas las experiencias sobre su manejo agronómico en nuestra región. También, son limitadas las informaciones sobre su origen, distribución geográfica, cariotipo y variabilidad genética de sus poblaciones (Bousalem *et al.* 2006). La diversidad genética de las poblaciones de *D. trifida* es necesario medir para establecer las bases para su mejoramiento genético. Actualmente, para realizar estudios de diversidad genética, disponemos de diversas técnicas moleculares que se basan en la reacción en cadena de la polimerasa. Estas técnicas son el ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD), polimorfismo en longitud de fragmentos amplificados (AFLP), microsatélites entre otras (Ferreira y Grattapaglia 1998). Además, de permitirnos evaluar la diversidad genética de una especie, las técnicas mencionadas, son útiles para estudios de filogenia molecular, filogeografía y caracterización molecular de colecciones de

germoplasma. De acuerdo a lo mencionado, el objetivo de esta investigación fue determinar la diversidad genética intra e interpoblacional de poblaciones de *D. trifida* de cinco cuencas hidrográficas de la amazonía peruana.

MATERIALES Y MÉTODOS

Colecta y transporte de material botánico

Las hojas de *D. trifida* fueron obtenidas de la colección de germoplasma de Sachapapa localizado en el Fundo de Zungarococha (3°50'13,6"LS y 73°22'12,8"LO), el cual consta de muestras de las cuencas hidrográficas del Itaya, Nanay, Ucayali, Tapiche y Marañón. Las muestras colectadas fueron transportadas en condiciones de refrigeración y protegidas de la luz para su procesamiento en la Unidad Especializada de Biotecnología (UEB) del Centro de Investigaciones de Recursos Naturales de la Amazonía (CIRNA), ubicado en el Pasaje Los Paujiles S/N. AAHH Nuevo San Lorenzo. Distrito de San Juan Bautista.

Purificación del ADN genómico

Se realizó según Ghislain *et al.* (2000) modificado y constó de los siguientes pasos: 1) 70 mg de hojas tiernas fueron mezcladas con 700 µL de buffer de extracción (Tris HCl pH 8,0, NaCl 1,4 M, EDTA 20 mM, CTAB 2 %, PVP 1 %) y 1µL de β-mercaptoetanol), 2) triturar completamente las hojas en un mortero por 3 min y agregar 150 µL de Buffer de extracción, 3) incubar a 65°C por 45 min homogenizando cada 15 min, 4) atemperar, agregar 500 µL de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) y mezclar por inversión lentamente los componentes por 5 min, 5) centrifugar a 20000 x g por 7 min, transferir el sobrenadante a otro microtubo y homogenizar con 100 µL de CTAB 10X, 6) añadir 700 µL de cloroformo – alcohol isoamílico (24:1), homogenizar lentamente por 5 min y centrifugar 20000 x g por 7 min. Repetir este paso hasta que la interfase (agua-cloroformo) esté limpia, 7) transferir el sobrenadante a un microtubo esteril, añadir igual volumen de isopropanol helado, mezclar por inversión, e incubar a -20 °C por 1 h, 8) centrifugar a 20000 x g por 13 min, descartar el sobrenadante y lavar el ADN precipitado con 1 mL de etanol al 70%, 9) centrifugar a 15000 x

g por 10 min, eliminar el sobrenadante y secar los microtubos sobre papel secante por 10 min a temperatura ambiente, 10) añadir 120 μ L de buffer TE (Tris-HCl 10 mM pH 8,0, EDTA 1 mM) e incubar por 30 min a 37°C. Agregar 1 μ L de ARNasa e incubar a 37°C por 30 min. Luego repetir los pasos 6 y 7, resuspender el ADN en buffer TE y almacenarlo a -20°C. La calidad y cantidad del ADN obtenido se determinó por análisis espectrofotométrico y electroforético según Sambrook *et al.* (1989).

Amplificación del ADN genómico con cebadores aleatorios (RAPD)

Para la reacción se empleó Buffer PCR 1 X, $MgCl_2$ 2,5 mM, desoxirribonucleótidos 0,8 mM, cebadores aleatorios (UNR, 17RB ó Da27R) 5 μ M, Taq DNA polimerasa 0,1U/ μ L, ADN genómico 100 ng y agua ultrapura c.s.p 20 μ L. La reacción se realizó en un termociclador Eppendorf Ep Gradient en las siguientes condiciones: 94°C por 5 min, 40 ciclos de 94°C por 1 min, 36°C por 1 min, 72°C por 1 min, extensión final a 72°C por 5 min. Los productos obtenidos fueron resueltos en gel de poliacrilamida al 10% a 100 V por 3 h. Las bandas de ADN fueron reveladas por tinción argéntica de los geles según Bassam y Gresshoff (2007). Posteriormente, los geles teñidos fueron fotografiados con una cámara digital Sony Cybershot de 14 Megapíxeles.

Análisis de datos

Todos los parámetros estadísticos de genética poblacional fueron estimados con el programa PopGene v1,3 de Yeh y Francis (1997). Estos parámetros fueron:

Distancia genética:

$$D_s(xy) = -\ln [J_{XY} / \sqrt{J_X J_Y}],$$

Donde: J_x y J_y representan la homocigosidad promedio para la población "X" y "Y", respectivamente

Flujo de genes (Nm):

$$Nm = 1/4(1/G_{ST} - 1)$$

G_{ST} = Diferenciación genética

Diferenciación genética (G_{ST}):

$$G_{ST} = 1 - HS/HT$$

HS: Heterocigosidad esperada

HT: Heterocigosidad total.

Heterocigosidad:

$HE = 1 - \sum p_i^2$, donde p_i es la frecuencia promedio del alelo p para todos los loci.

RESULTADOS

Purificación de ADN genómico

Con el protocolo empleado se ha logrado purificar a partir de hojas de *D. trifida* ADN genómico con dos características esperadas: calidad y cantidad adecuadas para estudios moleculares. La primera característica, fue demostrada con el análisis espectrofotométrico, con ratios de absorbancia promedio (260nm/280nm) de $1,7 \pm 0,1$ (Tabla 1).

Adicionalmente, el análisis electroforético indicó que el ADN aislado de *D. trifida* no está degradado (Figura 1). La segunda característica, cantidad de ADN, es suficiente para varios análisis moleculares, porque el protocolo empleado tuvo un rendimiento promedio de 582 ± 248 μ g ADN/mg hojas.

Diversidad genética intrapoblacional

Con los marcadores RAPD se ha encontrado que la diversidad genética intrapoblacional muestra diferencias entre las poblaciones *D. trifida* de las cinco cuencas estudiadas (Figura 2). La Población de del Itaya mostró la mayor diversidad genética intrapoblacional promedio ($h = 0,24 \pm 0,11$), seguida por la población del Nanay ($h = 0,21 \pm 0,08$). En contraste, las poblaciones con menor diversidad genética intrapoblacional promedio fueron de las cuencas del Ucayali ($h = 0,13 \pm 0,10$), Tapiche ($h = 0,07 \pm 0,05$) y Marañón ($h = 0,10 \pm 0,04$).

Diversidad genética interpoblacional

Este parámetro de genética poblacional mostró diferencias notables entre los pares de poblaciones *D. trifida* evaluados (Tabla 2). Así, los cuatro pares de poblaciones que mostraron mayor diversidad genética interpoblacional ($G_{ST} \geq 0,5$ y $\leq 1,0$) fueron los de Itaya vs Ucayali, Itaya vs Marañón, Ucayali vs Marañón e Itaya vs Nanay. Mientras que, los seis pares de poblaciones restantes mostraron valores $G_{ST} < 0,5$.

El flujo de genes entre las poblaciones influyó significativamente en el valor de la diversidad

genética inter poblacional (Figura 3). Siendo la tendencia general que a mayor flujo de genes entre las poblaciones (por ejemplo entre Nanay y Tapiche el $N_m = 6,31$) hay menor diversidad genética entre ellas (entre Nanay y Tapiche el $G_{ST}=0,07$) y viceversa, es decir, a menor flujo genético (por ejemplo entre Itaya y Ucayali el $N_m = 0,0$) se observó mayor diversidad genética entre las poblaciones (entre Itaya y Ucayali el $G_{ST}=1,0$).

Sin embargo, al evaluar si la distancia geográfica influye en la diversidad genética inter poblacional y el flujo de genes, no se encontró una relación clara (Figura 4). Aunque, se observa un ligero aumento de la diversidad genética entre los pares de poblaciones cuando es mayor la distancia geográfica entre ellas (Figura 4A). Esta tendencia no fue evidente con el flujo de genes entre las poblaciones y la distancia geográfica (Figura 4B).

Identidad y distancia genética entre las poblaciones

Estos parámetros de genética poblacional también mostraron diferencias entre los pares de poblaciones evaluados (Tabla 3). Es así,

que los pares de poblaciones que tuvieron mayores identidades genéticas ($\geq 0,90$) fueron las de Ucayali vs Tapiche, Nanay vs Ucayali, Nanay vs Marañón y Nanay vs Tapiche. Consecuentemente, estos pares de poblaciones presentaron menores distancias genéticas ($\leq 0,13$). En contraste, los otros pares de poblaciones exhibieron menores identidades genéticas ($\geq 0,62$ y $\leq 0,88$) y por tanto, mayores distancias genéticas ($\geq 0,17$ y $\leq 0,48$).

Relaciones filogenéticas entre las poblaciones

Las poblaciones de *D. trifida* muestran, en base a los marcadores RAPD, un grupo (cluster) que incluye a poblaciones de la mayoría de las cuencas hidrográficas, es decir, del Marañón, Nanay, Tapiche y Ucayali (Figura 5). Dentro de este cluster las poblaciones de Nanay y Tapiche son las que revelaron menor distancia genética, en consecuencia, mayor identidad genética. Mientras que, entre las poblaciones de Marañón y Ucayali hubo mayor distancia genética. Además, es evidente que la población de Itaya es la que presentó mayores distancias genéticas con las poblaciones de las otras cuencas hidrográficas.

Tabla 1. Valores de absorbancia, ratios de calidad y rendimiento en la cantidad de ADN obtenido de *D. trifida* con el protocolo de purificación empleado.

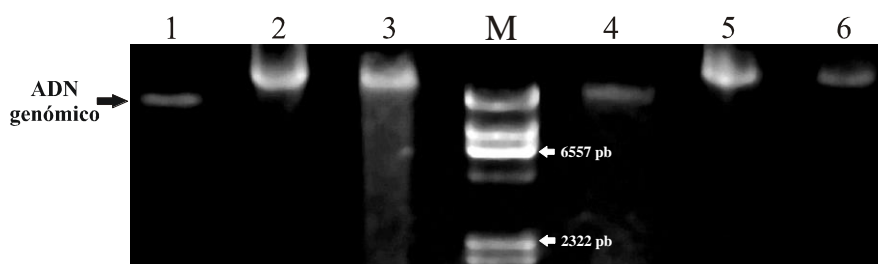
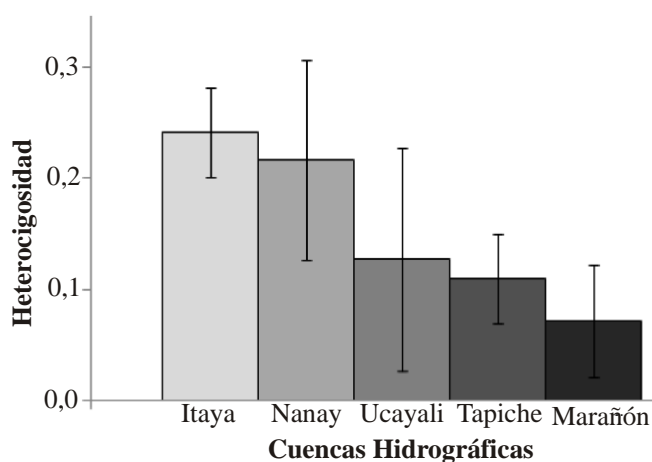
Muestra	Absorbancia		Ratio 260/280	Rendimiento (μ g ADN/7mg hoja)
	260 nm	28 nm		
<i>Df-01</i>	0,051	0,031	1,6	219
<i>Df-02</i>	0,073	0,040	1,8	311
<i>Df-03</i>	0,121	0,077	1,6	516
<i>Df-04</i>	0,121	0,071	1,7	519
<i>Df-05</i>	0,128	0,080	1,6	549
<i>Df-06</i>	0,186	0,105	1,8	795
<i>Df-07</i>	0,197	0,115	1,7	844
<i>Df-08</i>	0,211	0,124	1,7	902
Promedio	0,136	0,080	1,7	582
Desv Est	0,058	0,034	0,1	248

Tabla 2. Diversidad genética interpoblacional (G_{ST}) encontrada con marcadores RAPD entre pares de poblaciones de *D. trifida* de las cinco cuencas hidrográficas de la amazonía peruana.

	Nanay	Ucayali	Tapiche	Marañón
Itaya	0,57	1,0	0,49	0,84
Nanay		0,30	0,07	0,21
Ucayali			0,31	0,69
Tapiche				0,28

Tabla 3. Identidad (diagonal superior derecha) y distancia genética (Diagonal inferior izquierda) de Nei (1973) entre pares de poblaciones de *D. trifida* de las cinco cuencas hidrográficas.

	Itaya	Nanay	Ucayali	Tapiche	Marañón
Itaya		0,70	0,63	0,75	0,62
Nanay	0,36		0,92	0,98	0,94
Ucayali	0,46	0,08		0,90	0,84
Tapiche	0,29	0,02	0,11		0,88
Marañón	0,48	0,17	0,17	0,13	

**Figura 1.** Electroforesis del ADN genómico purificado a partir de hojas de seis plantas de *D. trifida*. 1-6 : muestras, M : marcador de peso molecular (Lambda DNA/Hind III).**Figura 2.** Diversidad genética intrapoblacional encontrada con marcadores RAPD en poblaciones de *D. trifida* de cinco cuencas hidrográficas de la amazonía peruana.

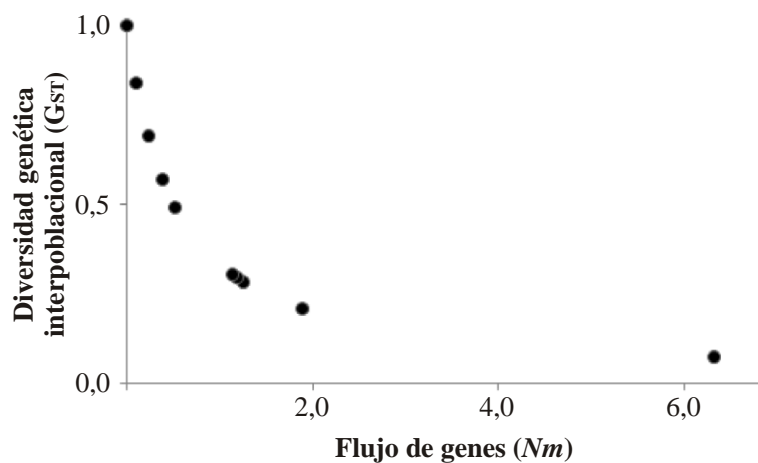


Figura 3. Relación entre la diversidad genética interpoblacional y el flujo de genes entre los pares de poblaciones de *D. trifida* de las cuencas hidrográficas de Itaya, Nanay, Ucayali, Tapiche y Marañón.

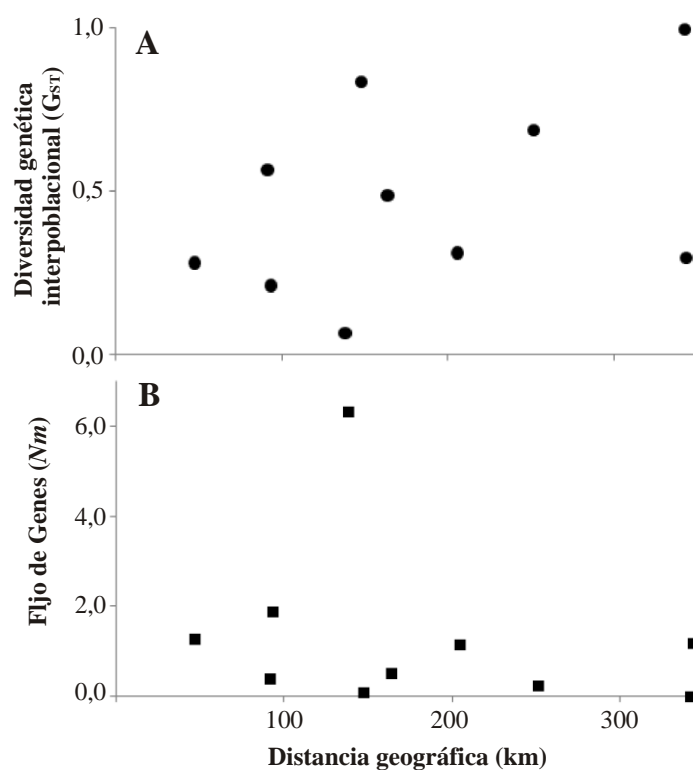


Figura 4. Relación entre la diversidad genética interpoblacional (A) y el flujo de genes (B) con la distancia geográfica entre los pares de poblaciones de *D. trifida* de las cuencas hidrográficas de Itaya, Nanay, Ucayali, Tapiche y Marañón.

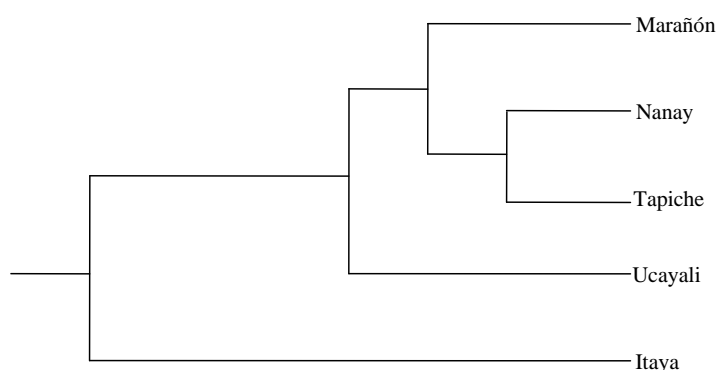


Figura 5. Dendrograma que muestra las relaciones filogenéticas en base a las distancias genéticas entre las poblaciones de *D. trifida* de las cinco cuencas hidrográficas de la amazonía peruana.

DISCUSIÓN

La purificación de ácidos nucleicos es la primera etapa para realizar estudios moleculares de cualquier especie vegetal. Pero, los tejidos vegetales tienen cantidades y tipos variables de contaminantes químicos, como metabolitos secundarios, polisacáridos, polifenoles, taninos, entre otros (Naresh *et al.* 1996). La presencia diferencial de estas sustancias imposibilita el desarrollo de un protocolo universal para purificar el ADN de las plantas. En consecuencia, un determinado protocolo desarrollado para una especie o tejido vegetal no suele funcionar en otras especies o tejidos vegetales (Varadajaram y Prakash, 1991). Además, varios factores como la marca, lote de reactivos, materiales y experiencia del personal influyen en la reproducibilidad de un determinado protocolo.

Sin embargo, con el protocolo de purificación de ADN basado en Ghislain *et al.* (1997) logramos aislar ADN genómico a partir de hojas de *D. trifida*. Este material genético se caracterizó por ser de alta calidad (Tabla 1 y Figura 1) y cantidad adecuada (Tabla 1) para estudios de diversidad genética molecular. La alta calidad del ADN purificado también se evidenció por la síntesis exitosa de amplicones RAPD. Porque la presencia de contaminantes como los mucílagos, que son comunes en tejidos vegetales, forman complejos con el ADN y pueden inhibir a diversas enzimas que suelen emplearse para estudios moleculares,

tales como las endonucleasas de restricción (Wilkie *et al.* 1993) y las ADN polimerasas (Fang *et al.* 1992). Adicionalmente, la cantidad de ADN obtenida es suficiente para realizar diversos estudios moleculares, como estos se basan en la reacción en cadena de la polimerasa sólo se requieren cantidades mínimas de ADN genómico (Ferreira y Grattapaglia 1998). Así por ejemplo, con el protocolo descrito el rendimiento más bajo nos genera 219 µg de ADN/mg de hoja de *D. trifida* (Tabla 1), es decir, a partir de 1 mg de tejido vegetal podríamos obtener suficiente ADN para más de 2000 reacciones de PCR.

Con la técnica RAPD se amplificó regiones polimórficas anónimas del genoma de *D. trifida*. Permittiéndonos determinar la diversidad genética poblacional de esta especie en cinco cuencas hidrográficas de la amazonía peruana. Similarmente, con esta técnica Gonzales (2003) obtiene 96,8% de variabilidad genética en *D. trifida* y *D. alata*. Adicionalmente, Ramser *et al.* (1996) mediante RAPD analizan 22 accesiones de *D. rotundata* y *D. cayenensis* registrando 89,2% de variabilidad genética. De acuerdo con Williams *et al.* (1990), los polimorfismos detectados con la técnica RAPD pueden deberse a delecciones e inserciones o sustituciones nucleotídicas en las secuencias complementarias de los cebadores aleatorios empleados. También, los polimorfismos pueden ser el resultado de delecciones o

inserciones en las regiones internas de los amplicones, las que están flanqueadas por las secuencias complementarias de los cebadores aleatorios.

Según Hartl y Clark (1997), la diversidad genética de las poblaciones se debe a la acción simultáneamente de varias fuerzas evolutivas y la evolución es resultado de la interacción compleja de numerosos procesos. Entre estos podemos mencionar a la mutación, la selección natural, la migración y la deriva genética. Estas fuerzas evolutivas afectan tanto la variación genética dentro de las poblaciones como la divergencia genética entre las poblaciones. La diversidad genética intrapoblacional puede aumentar debido a la mutación, migración y algunos tipos de selección y puede disminuir mediante la deriva genética y algunos tipos de selección natural.

Muchos de estos procesos también dependen de las prácticas agrícolas de los pobladores amazónicos. Es decir, los agricultores prefieren realizar la reproducción vegetativa (no suelen usar semillas) de sus plantas de *D. trifida* para generar tubérculos de tamaño y calidad uniforme. Esta práctica agrícola estaría propiciando la disminución de la diversidad genética intrapoblacional e incrementando la diversidad genética interpoblacional. Pero si los agricultores siembran tubérculos obtenidos de otras cuencas hidrográficas, lo cual sucede con frecuencia, porque consiguen de otras chacras o de los mercados, estarían contribuyendo a incrementar la diversidad genética intrapoblacional en sus sembríos y disminuyendo la diversidad genética interpoblacional. Es decir, el flujo de genes propiciada o limitada por estas prácticas agrícolas estaría determinando los resultados de diversidad genética intra e interpoblacional que hemos obtenido en este estudio. De acuerdo con Sanchez *et al.* (2001), la diversidad genética no es estática, con el paso del tiempo hay genotipos que salen y otros que se incorporan al sistema de producción del agricultor y con ello la dispersión de los

tubérculos a diferentes lugares. Adicionalmente, Cruz *et al.* (1999), indican que la distribución y la distancia geográfica ejercen una pequeña influencia sobre la variabilidad de las especies de dioscoreas.

La investigación realizada tuvo varias limitaciones que necesitamos mencionar. Por una parte el reducido número de muestras por cuenca hidrográfica, lo cual puede ser insuficiente para realizar inferencias confiables en cuanto a la diversidad genética intra e interpoblacional y las relaciones filogenéticas observadas. Adicionalmente, la técnica de ADN polimórfico amplificado al azar se caracteriza por su escasa reproducibilidad entre diferentes laboratorios y los cebadores aleatorios fueron de más de 20 nucleótidos y no los que se suelen emplear en la técnica que son de 10 nucleótidos.

Es necesario realizar más investigaciones de este tubérculo amazónico promisorio. Los que garantizarán el aprovechamiento sustentable de la especie y propiciará su cultivo. Asimismo, es pertinente realizar más estudios de genética poblacional de la especie con uso de otras técnicas moleculares. También, es importante realizar investigaciones para identificar marcadores genéticos ligados a la resistencia a factores bióticos y abióticos adversos, identificación de marcadores asociados con el tamaño de los tubérculos y contenido de antocianinas, diosgeninas y otras sustancias de interés medicinal.

CONCLUSIONES

Con el protocolo descrito se ha purificado el ADN genómico a partir de hojas de *D. trifida*, que se caracteriza por ser de alta calidad y cantidad adecuadas para estudios moleculares con la técnica RAPD. Asimismo, se evidencia que *D. trifida* muestra variación en la diversidad genética intra e interpoblacional en las cinco cuencas hidrográficas de la amazonía, siendo la cuenca del Itaya la que presenta mayor diversidad genética intrapoblacional y las poblaciones de Itaya vs Ucayali las que mostraron mayor diversidad genética interpoblacional, que en parte se debió a diferencias en el flujo de genes entre las poblaciones analizadas. Finalmente, la

identidad y distancia genética fueron variables entre los pares de poblaciones de *D. trifida*. Siendo las poblaciones de Nanay vs Tapiche genéticamente las más idénticas y menos distantes. En contraste, las poblaciones de Itaya vs Marañón fueron genéticamente menos idénticas y más distantes.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana (UNAP) por el financiamiento del Proyecto de Investigación "Selección de clones superiores de *Dioscorea trifida* L., "sachapapa" en base a su caracterización morfológica, molecular y fitoquímica, de la Región Loreto" y uno de los resultados de esta investigación es el presente artículo. Asimismo, agradecemos al Dr. Jorge Luis Marapara Del Águila por brindarnos facilidades para el acceso y uso de equipos de la Unidad Especializada de Biotecnología del CIRNA-UNAP.

REFERENCIAS

- Bassam BJ and Gresshoff PM 2007. Silver staining DNA in polyacrylamide gels. Nat. Protoc. 2(11), 2649-2654.
- Bousalem M, Arnau G, Hochu I, Arnolin R, Viader V, Santoni S, David, J. 2006. Microsatellite segregation analysis and cytogenetic evidence for tetrasomic inheritance in the American yam *Dioscorea trifida* and a new basic chromosome number in the Dioscoreae. Theor Appl Genet. 113 (3), 439-451.
- Cruz VMV, Altoveros NC, Mendiolo MS, Ramírez DA. 1999. Geographical patterns of diversity in the Philippine edible yam collection. Plant Genet Resour Newsl 119, 7-11.
- Fang G, Hammar S, Grumet R. 1992. A quick and inexpensive method for removing polysaccharides from plant genomic DNA. Biotechniques. 13(1), 52-4, 56.
- Ghislain M, Rodriguez F, Villamón F, Nuñez J, Waugh R, Bonierbale M. 2000. Establishment of microsatellite assays for potato genetic identification. CIP Program Report. 167-174.
- Ferreira ME, Grattapaglia D. 1998. Introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético. 1ra Edición Brasilia; EMBRAPA. 221 páginas.
- Gonzales YC. 2003. Caracterización morfológica y molecular de genotipos de *Dioscorea alata* y *D. trifida* del Instituto de Investigación Agropecuaria de Panamá, IDIAP y CATIE, Costa Rica. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), 93 páginas.
- Hartl DL, Clark AG. 1997. Principles of Population Genetics. Third edition. Sinauer Associates, Inc. Publishers. Sunderland, Massachussets. 542 pages.
- Heble MR and Staba EJ. 1980. Steroid metabolism in stationary phase cell suspensions of *Dioscorea deltoidea*. Planta Med 40, 124-128.
- Montaldo A. 1991. Cultivo de raíces y tubérculos tropicales. Segunda edición. IICA. San José de Costa Rica. 403 páginas.
- Nei M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. Proc Natl Acad Sci USA 70 (12), 3321-3323.
- Nareh R, Adams R, Flournoy L. 1996. Inhibition of random amplified polymorphic DNAs (RAPDs) by plant polysaccharides. Plant Mol Biol Rep 14 (1), 17-22.
- Ramser J, Weising K, Kahl G, López-Peralta C, Wetzel R. 1996. Genomic variation and relationships in aerial yam (*Dioscorea bulbifera* L.) detected by random amplified polymorphic DNA. Genome. 39 (1), 17-25.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sánchez R, Milián M, Morales A, Rodriguez S, Rayas A, Gonzalez L, Morales L, Alarcón M. 2001. Raíces y tubérculos útiles del trópico, plátanos y bananos para obtener nuevas variedades con la participación de los productores. Simposio Internacional y Talleres sobre Fitomejoramiento Participativo (FMP) en América Latina y el Caribe. Pág. 120-130.

- Varadarajan GS, Prakash CS. 1991. A rapid and efficient method for the extraction of total DNA from the sweet potato and its related species. *Plant Mol. Biol. Rep.* 9 (1), 6-12.
- Vásquez J y Rojas C. 2002. Plantas de la Amazonia Peruana. Clave para identificar las familias de Gymnospermae y Angiospermae *ARNALDOA* 13 (1), 9-258.
- Villarejo A. 2005. Así es la Selva; Quinta Edición Centro de estudios Tecnológicos. Editorial Omega, Pág. 61-67.
- Wilkie SE, Issac PG and Slater RJ. 1993. Random amplification polymorphic DNA (RAPD) markers for genetic analysis in *Allium*. *Theor Appl Genet* 86 (4), 497-504.
- Willians JG, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18(22), 6531-6535.
- Yeh FC, Yang RC, Boyle T, Ye Z-H and Mao, JX. 1997. POPGENE: the user-friendly shareware for population genetic analysis. Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta, Canada. <http://www.ualberta.ca/~fyeh/> [Consultado Enero 28, 2013]