

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

Evelyn REÁTEGUI-ZIRENA<sup>1</sup>, Jean-François RENNO<sup>3</sup>, Fernando CARVAJAL VALLEJOS<sup>4</sup>, Ronald CORVERA<sup>2</sup>, Dennis DEL-CASTILLO<sup>2</sup>, Carmen GARCÍA-DÁVILA<sup>2</sup>

1 Becario Pre-grado IAP-INCAGRO. Iquitos, Perú. E-mail: erezirena@gmail.com

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

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

4 Universidad Mayor San Simón. Cochabamba, Bolivia.

### RESUMEN

La diversidad genética poblacional de *Bertholletia excelsa* “castaña” fue estimada en siete localidades del departamento de Madre de Dios. Se colectaron un total de 164 muestras, las cuales fueron evaluadas con seis *loci* microsatélites. Todos los *loci* microsatélites resultaron polimórficos, reportándose un total de 47 alelos, con una media de 7.83 por locus. Los resultados de AFC, SAMOVA (98.06% de la variación se encuentra dentro de las localidades y solo 2.24% entre ellas) y distancia genética (distancia promedio = 0.017), mostraron que las siete localidades evaluadas presentan poca diferenciación genética entre ellas; presentado un elevado flujo genético demostrado en los resultados de  $Nm$  que variaron de 6.26 al infinito. También, los resultados globales de  $F_{ST}$  (0.024),  $R_{ST}$  (0.045) muestran una débil diferenciación genética entre las poblaciones. En términos generales, cada localidad presenta una amplia variabilidad genética con pocas diferencias entre ellas. Considerando el conjunto de localidades como una única población no se observa diferencia a la panmixia ( $H_o = 0.68$ ,  $H_e = 0.69$ ,  $F_{is} = 0.01$ ). Los resultados obtenidos tanto dentro de las localidades como entre ellas pueden ser atribuidos a las escasas barreras físicas entre las localidades, un tiempo de generación alto y una duración de vida alta de los árboles (numero eficiente alto) y un sistema de reproducción alogámico de la castaña.

PALABRAS CLAVE: *Bertholletia excelsa*, castaña, Amazonía, microsatélites.

## ASSESSMENT OF GENETIC VARIABILITY OF BRAZIL NUT *Bertholletia excelsa* OF REGION MADRE DE DIOS (PERU), USING MICROSATELLITE MARKERS

### ABSTRACT

Population genetic diversity *Bertholletia* Brazil nut was estimated at seven locations in the department of Madre de Dios. We collected a total of 164 samples, which were evaluated with six microsatellite loci. All microsatellite loci were polymorphic, reporting a total of 47 alleles, with an average of 7.83 per locus. The results of AFC, SAMOVA (98.06% of the variation is within the locality and only 2.24% between them) and genetic distance (average distance = 0.017) showed that the seven locations studied had low genetic differentiation between them, presented a demonstrated high gene flow ( $Nm$  results ranging of 6.26 to infinity). Also, the overall results of  $F_{ST}$  (0.024),  $R_{ST}$  (0.045) show a weak genetic differentiation among populations. In general, each locality has a wide genetic variability with little difference between them ( $H_o = 0.68$ ,  $H_e = 0.69$ ,  $F_{is} = 0.01$ ). The results obtained both within localities and between them can be attributed to poor physical barriers between localities, a generation time high and a lifetime high of trees (high efficient number) and a system of reproduction allogamous Brazil nut.

KEYWORDS: *Bertholletia excelsa*, Brazil nut, Amazon, microsatellites.

## INTRODUCCIÓN

La Amazonía peruana presenta una extensión de  $756,866 \text{ km}^2$  y constituye la décima parte de todos los bosques del mundo (Kalliola *et al.*, 1993). El departamento de Madre de Dios se encuentra ubicado en el sur-oriente peruano, abarca tanto selva alta como selva baja y se caracteriza por presentar un clima tropical cálido y húmedo. Este departamento está formado principalmente por llanuras aluviales con terrazas de tres hasta cuatro niveles (Lawrence *et al.*, 2005). La transición entre selva alta y baja (ecotono) hace que esta región posea una gran biodiversidad de flora y fauna que abren potencialidades económicas diversas. Sin embargo, muchas de las actividades económicas impactan negativamente sobre el ambiente. Razón por la cual, se viene promoviendo actividades menos impactantes y más sostenibles como el cultivo de productos no maderables. Que generen por un lado un adecuado ingreso económico para la gente local y por el otro la preservación de los ecosistemas tropicales, con mínima perturbación del ecosistema natural (Ramírez, 2006; Moegenburg & Levey, 2002; Zuidema & Boot, 2002; Camargo *et al.*, 1994). Una alternativa para evitar la deforestación es la "castaña" *Bertholletia excelsa* (Humboldt & Bonpland, 1808), especie con potencial económico en esta región, debido primero a que presenta frutos cuyas semillas poseen alto contenido de selenio (ayuda a detener los procesos degenerativos de las células cancerígenas); y segundo que posee un desarrollo agronómico y tecnológico ya establecido (Pastor, 2004; Thomson *et al.*, 2008). En los últimos años la región de Madre de Dios ha presentado un acelerado crecimiento económico. Que si bien ha contribuido al mejoramiento en el nivel de vida de su población, ha causado una corriente migratoria hacia la zona, originando la creación de nuevos asentamientos humanos. Los cuales, ejercen una fuerte presión sobre los recursos naturales del bosque, convirtiendo áreas forestales en nuevas áreas de cultivos agropecuarios, causando con esto una inminente deforestación y por ende disminución en las poblaciones naturales de la castaña (Motta, 2002), desconociéndose el estado de conservación genética de sus poblaciones naturales (Kanashiro *et al.*, 1997). Actualmente los marcadores moleculares son fuertemente utilizados en la evaluación del estado de conservación genética de las especies, porque permiten determinar la variabilidad genética, el flujo de genes y otros parámetros poblacionales (Karp *et al.*, 1997, Azofeifa-Delgado, 2006). En ese sentido el presente estudio tuvo por objetivo utilizar los marcadores moleculares microsatélites o SSR (Simple Sequence Repeats) para la evaluación de la variabilidad genética de la castaña en poblaciones naturales de la región de Madre de Dios.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### MUESTREO DE MATERIAL BIOLÓGICO

Fueron colectadas muestras de tejido foliar de 164 árboles proveniente de siete localidades naturales de *Bertholletia excelsa* "castaña" de la región de Madre de Dios (Figura 1): MUYMANU (S 75° 18' 49"; W 11° 41' 31"), MANURIPE (S 75° 13' 6"; W 11° 54' 13"), PIEDRAS (S 75° 24' 8"; W 12° 8' 30"), PARIAMARCA (S 75° 30' 24"; W 12° 19' 0"), PARIAMANU (S 75° 31' 33"; W 12° 29' 12"), PAMPA HERMOSA (S 75° 8' 52"; W 12° 20' 33") y VALENCIA (S 74° 52' 43"; W 12° 27' 8").

### EXTRACCIÓN Y AMPLIFICACIÓN DE ADN

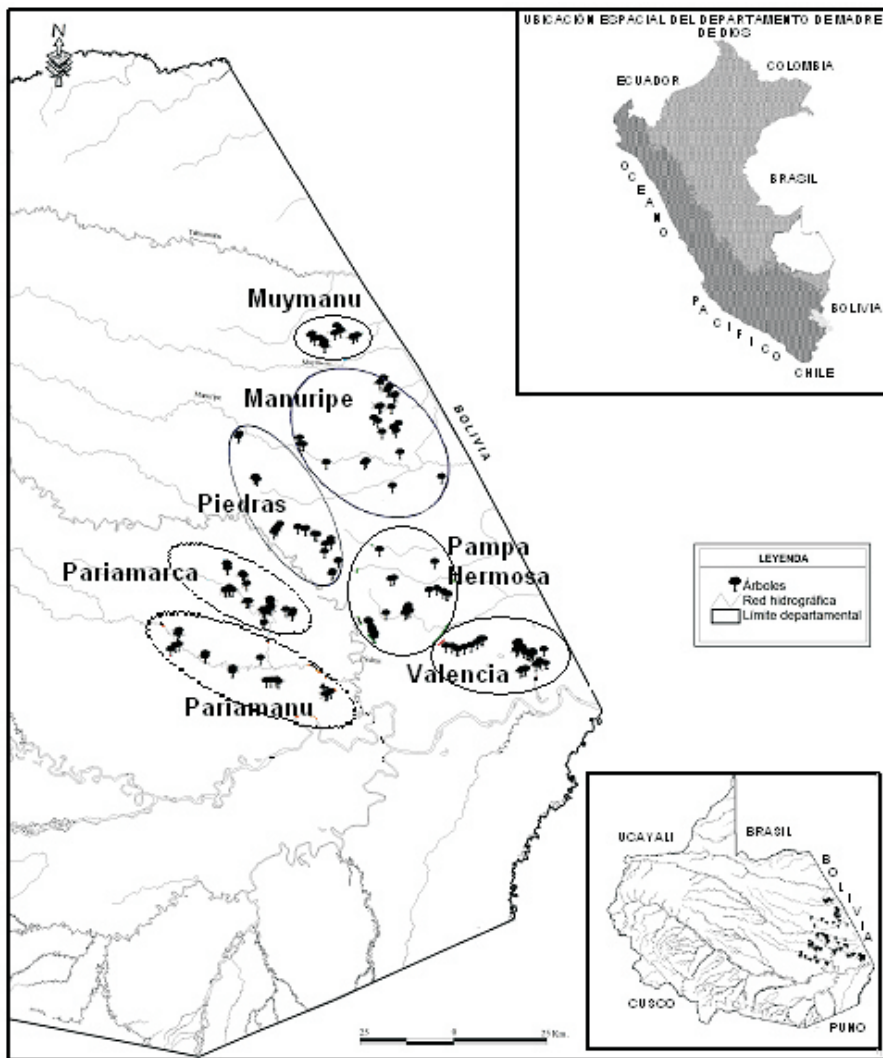
La extracción de ADN, fue realizada mediante el protocolo CTAB de Doyle & Doyle (1987), a partir de 100 mg de tejido foliar; y la amplificación del ADN, se realizó a través de la técnica de microsatélites, utilizando seis pares de primers selectivos (Tabla 1). Cada marcador amplificó una determinada región del genoma (locus). La reacción de amplificación fue realizada en un volumen total de 10  $\mu\text{l}$ , conteniendo 5 U/ $\mu\text{l}$  de Taq polimerasa, 1  $\mu\text{l}$  de ADN molde, 5X de Buffer, 10mM dNTPs, 25mM de  $\text{MgCl}_2$ , 10  $\mu\text{M}$  de cada primer y agua ultrapura. Las condiciones de temperatura fueron: denaturación inicial a 96°C durante 2min.; seguida de 35 ciclos (denaturación a 94°C de 1min., hibridación a 56.8°C de 1min., y extensión a 72°C de 1min); seguida de una extensión final a 72 °C de 10 min. Los productos de amplificación fueron desnaturalizados y separados mediante electroforesis capilar utilizando un analizador genético (Applied Biosystems) 3130. Se tomó 1  $\mu\text{l}$  del producto de PCR, junto con 8.6  $\mu\text{l}$  de Formamida y 0.4  $\mu\text{l}$  de GeneScan 500 ROX (marcador de peso molecular). El peso de los alelos (variación del tamaño del fragmento al locus amplificado) fue determinado usando el software Peak Scanner versión 1.0 (<https://products.appliedbiosystems.com>).

### ANÁLISIS DE DATOS

La variación alélica, variabilidad genética intra localidad, número medio y total de alelos por locus y por localidad, alelos privados (alelos encontrados en una sola localidad), la heterocigosidad esperada ( $H_e$ ) y heterocigosidad observadas ( $H_o$ ) por locus y por localidad, fueron calculadas con la ayuda del software GenAlex versión 6.0 (Peakall & Smouse 2005); así como las desviaciones del equilibrio de Hardy-Weinberg, calculadas comparando los valores de  $F_{IS}$  observada con los valores  $F_{IS}$  teóricas por 1000 poblaciones panmicticas artificiales, generadas por 1000 permutaciones al azar entre los alelos en cada locus. La probabilidad de existencia de alelos nulos se

estimó mediante el programa Cervus 2.0 (Marshall *et al.*, 1998) de acuerdo a Brookfield (1996). La variabilidad genética entre las localidades fue ilustrada mediante el Análisis Factorial de Correspondencia (AFC), la diferenciación entre las localidades fue estimada en base al índice de fijación ( $F_{st}$ ), el flujo genético mediante el número de migrantes ( $Nm$ ) por generación (calculado obtenido en base a los valores de  $F_{ST}$  y  $R_{ST}$ ); todos estos análisis fueron realizados con la ayuda del software Genetix versión 4.05 (Belkhir *et al.*, 2004). El estimador de diferenciación específica de microsatélites ( $R_{ST}$ ), que es un estimador que considera un modelo de evolución “step by step” de los microsatélites, fue estimado con

el programa  $R_{ST}$  Calc versión 2.2 (Goodman, 1997). El Análisis espacial de la varianza molecular SAMOVA es un test que permite evaluar la significancia de la varianza molecular sin *a priori* indicar la procedencia geográfica de los individuos, buscando la estructura con una varianza máxima entre grupos de poblaciones (aquí localidades) y entre localidades dentro de grupos. La SAMOVA fue probada por 1000 permutaciones de individuos para cada nivel jerárquico utilizando el programa SAMOVA (Dupanloup *et al.*, 2002) y Arlequín 3.11 (Excoffier *et al.*, 1992). Se testaron dos ( $k=2$ ), tres ( $k=3$ ), cuatro ( $k=4$ ) y cinco ( $k=5$ ) grupos.



**Figura 1.** Mapa del departamento de Madre de Dios indicando la ubicación geográfica de las siete localidades donde fueron colectadas las muestras de castaña *Bertholletia excelsa* evaluadas en el estudio.

**Tabla 1.** Nombre, motivo de repetición, secuencia de los primers microsateles; rango de tamaño y número de alelos encontrados en la castaña *Bertholletia excelsa* de la región de Madre de Dios.

LOCUS	MOTIVO DE REPETICIÓN	SECUENCIA DE PRIMERS REIS <i>et al.</i> , 2008	RANGO TAMAÑO ALELOS	Nº ALELOS
Bex03	(AG) <sub>13</sub>	F: CTACCTACAGGTCGGTGCCA R: CGTATTTCTGTCAAACCTCT	92 - 106	4
Bex22	(CT) <sub>38</sub>	F: GCATTCTCTCATTTTCGCTTG R: CCCTAGCAATCGTCGTCTTC	118 - 136	9
Bex01	(AG) <sub>22</sub>	F: TTCCAGGCATTTTGTACAG R: CAAGAGCGCAGGAGAAGATT	210 - 248	7
Bex09	(CT) <sub>32</sub>	F: TATTCCATGGTCCTCCGT R: AGTCAATCATCTTCAAGAGT	98 - 138	6
Bex30	(CT) <sub>23</sub> (CA) <sub>15</sub>	F: TGGAACGGTCACTTGAGACA R: CCCTCTCTCCTTCGCTTTTT	130 - 170	10
Bex37	(CT) <sub>19</sub>	F: TGCATGCTATGTTTCATTGCT R: CACGCAACCTCACAGTCTTG	176 - 204	11

Abreviaturas: Forward (F), Reverse (R),.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### VARIABILIDAD GENÉTICA Y PANMIXIA

Los 164 individuos de castaña presentaron 47 alelos con los seis marcadores microsateles evaluados (tabla 1). La media de alelos por locus fue 7.83, comparable con los niveles encontrados utilizando marcadores microsateles en otros árboles tanto de regiones tropicales como de climas templados. Por ejemplo podemos mencionar *Pithecellobium elegans*, *pithecellobium* (A=7.8; Chase *et al.*, 1996), *Pinus strobus*, pino blanco (A=7.7; Marquardt y Epperson, 2004), *Quercus petraea*, roble albar (A=7; Muir *et al.*, 2004), *Pinus resinosa*, pino rojo (A=9; Boys *et al.*, 2005), *Populus tremuloides*, álamo temblón (A=8.3; Cole, 2005), *Cocos nucifera*, coco (A=7.35; Rajesh *et al.*, 2008). Elevados valores de variación genética fueron encontrados también en poblaciones naturales de castaña en la Amazonía brasilera (68.7%) cuando fueron evaluados con marcadores moleculares RAPD (Kanashiro *et al.*, 1997).

Los valores de heterocigosidad esperada ( $H_e$ ) variaron de 0.54 en el locus Bex01 a 0.77 en el locus Bex09. En tanto que la heterocigosidad observada ( $H_o$ ) variaron de 0.52 en el locus Bex01 a 0.74 en el locus Bex37. La heterocigosidad multilocus observada y esperada son idénticas en cada localidad y varían muy poco entre

ellas (Manuripe:  $H_e = 0.65$ ,  $H_o = 0.66$ ; Piedras:  $H_e = 0.70$ ,  $H_o = 0.71$ ). En el análisis global considerando todas las localidades como una única unidad, no encontramos diferencia a la panmixia, ya sea a nivel de locus o multilocus (tabla 2). Estos resultados pueden estar íntimamente relacionados con la naturaleza alógama y la existencia de un sistema de autoincompatibilidad de la especie favoreciendo la conservación del alto porcentaje de heterocigosos (Motta, 2002). Frankham *et al.* (2008) indican que altos niveles de variabilidad genética son generalmente encontrados en plantas arbóreas perennes pues son utilizados como mecanismos que garantizan la sobrevivencia y adaptación de las especies; ya que la pérdida de esta variabilidad reduce el potencial evolutivo y el suceso reproductivo de las mismas.

Conociéndose que el número de alelos privados es una estimativa indirecta del flujo génico (Takahashi *et al.*, 2005), y cuanto más bajo sea éste, más alelos de este tipo surgen por mutación, y son fijados por eventos de deriva genética en una población (Slatkin, 1985). Además, que la presencia de estos alelos, parece caracterizar a poblaciones antiguas y relictas; al contrario su completa ausencia podría indicar que las poblaciones tienen un origen relativamente reciente (Fernández-Palacios, 2004).

**Tabla 2.** Frecuencia de alelos, heterocigosidad esperada y observada, Fis por locus y localidades de castaña *Bertholletia excelsa* estimados para las muestras analizadas de la región de Madre de Dios.

LOCUS	ALELOS	PIEDRAS n = 24	VALENCIA n = 23	P. HERMOSA n = 23	MANURIBE n = 26	MUYMANU n = 23	PARIAMANU n = 23	PARIAMARCA n = 22
	218	0.50	0.07	0.67	0.73	0.74	0.65	0.61
	220	0.15	0.02	0.13	0.08	0.00	0.09	0.16
	230	0.10	0.09	0.00	0.06	0.04	0.04	0.02
	232	0.10	0.13	0.00	0.08	0.04	0.11	0.05
Bex01	238	0.02	0.00	0.04	0.00	0.00	0.04	0.09
	242	0.13	0.07	0.15	0.06	0.15	0.07	0.05
	252	0.00	0.00	0.00	0.00	0.02	0.00	0.02
	He	0.69	0.49	0.50	0.45	0.43	0.55	0.58
	Ho	0.67	0.43	0.48	0.54	0.43	0.57	0.50
	Fis	-0.05	-0.13	0.02	-0.14	-0.08	0.02	0.29
Bex03	88	0.10	0.15	0.04	0.10	0.04	0.26	0.20
	94	0.17	0.28	0.35	0.29	0.24	0.35	0.18
	96	0.48	0.33	0.35	0.40	0.39	0.33	0.43
	102	0.25	0.24	0.26	0.21	0.33	0.07	0.18
	He	0.67	0.73	0.69	0.70	0.68	0.70	0.71
	Ho	0.75	0.74	0.70	0.65	0.78	0.65	0.63
	Fis	-0.10	0.01	0.01	0.09	-0.13	0.09	0.12
Bex09	116	0.35	0.24	0.30	0.27	0.22	0.26	0.30
	122	0.31	0.30	0.33	0.31	0.28	0.15	0.25
	128	0.06	0.04	0.04	0.04	0.09	0.09	0.11
	130	0.06	0.28	0.28	0.29	0.24	0.33	0.27
	132	0.08	0.00	0.00	0.00	0.00	0.09	0.05
	134	0.13	0.13	0.04	0.10	0.17	0.09	0.02
	He	0.75	0.75	0.72	0.74	0.78	0.78	0.76
	Ho	0.67	0.91	0.61	0.69	0.70	0.61	0.82
	Fis	0.13	-0.19	0.17	0.08	0.13	0.24*	0.05
Bex22	125	0.08	0.11	0.00	0.10	0.00	0.17	0.14
	131	0.13	0.11	0.07	0.13	0.20	0.00	0.05
	133	0.40	0.52	0.47	0.42	0.46	0.54	0.57
	135	0.04	0.07	0.04	0.10	0.07	0.02	0.00
	137	0.27	0.13	0.24	0.23	0.17	0.26	0.18
	143	0.04	0.04	0.09	0.00	0.07	0.00	0.07
	151	0.00	0.00	0.00	0.02	0.00	0.00	0.00
	161	0.04	0.02	0.09	0.00	0.02	0.00	0.00
	163	0.00	0.00	0.00	0.00	0.02	0.00	0.00
	He	0.74	0.68	0.69	0.73	0.71	0.61	0.62
	Ho	0.79	0.78	0.70	0.85	0.78	0.61	0.45
	Fis	-0.05	-0.13	0.02	-0.14	-0.08	0.02	0.29
Bex30	130	0.06	0.07	0.09	0.10	0.11	0.17	0.18
	142	0.02	0.07	0.09	0.02	0.02	0.00	0.00
	146	0.00	0.07	0.04	0.02	0.04	0.07	0.05
	158	0.13	0.02	0.04	0.19	0.13	0.26	0.18
	160	0.02	0.00	0.00	0.00	0.02	0.00	0.00
	162	0.56	0.57	0.57	0.56	0.54	0.40	0.50
	164	0.04	0.07	0.07	0.00	0.02	0.00	0.02
	172	0.02	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.02
	174	0.15	0.15	0.11	0.12	0.11	0.11	0.05
	176	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.02	0.00
	He	0.64	0.64	0.65	0.63	0.66	0.75	0.68
	Ho	0.71	0.70	0.65	0.65	0.61	0.87	0.64
	Fis	-0.086	-0.07	0.01	-0.02	0.01	-0.14	0.09
Bex37	190	0.00	0.00	0.00	0.20	0.15	0.00	0.00
	196	0.04	0.00	0.00	0.06	0.02	0.00	0.00
	200	0.50	0.39	0.46	0.52	0.39	0.39	0.41
	202	0.04	0.00	0.00	0.00	0.02	0.00	0.00
	204	0.00	0.00	0.00	0.00	0.02	0.00	0.00
	206	0.02	0.02	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	208	0.19	0.17	0.22	0.19	0.21	0.41	0.43
	210	0.04	0.07	0.20	0.08	0.07	0.04	0.05
	212	0.17	0.26	0.13	0.13	0.09	0.13	0.09
	214	0.00	0.09	0.00	0.00	0.00	0.02	0.02
	218	0.00	0.00	0.00	0.00	0.02	0.00	0.00
	He	0.68	0.74	0.69	0.67	0.76	0.66	0.64
	Ho	0.67	0.91	0.65	0.77	0.78	0.78	0.64
	Fis	0.04	-0.22	0.08	-0.14	-0.00	-0.17	0.02
Multilocus	He	0.70	0.67	0.66	0.65	0.67	0.67	0.66
	Ho	0.71	0.69	0.67	0.66	0.69	0.69	0.68
	Fis	0.00	-0.09	0.06	-0.04	0.01	0.01	0.10

significancia: \* $p < 0.05$



En el caso de la castaña se identificaron cinco alelos privados (alelos exclusivos para una localidad), en tres de las siete localidades, uno en Muymanu (Locus/alelo/frecuencia = Bex37/204/0.04), uno en Pariamanu (Locus/alelo/frecuencia = Bex30/176/0.02), y tres en Manuripe. (Locus/alelo/frecuencia = Bex22/151/0.01, Bex22/163/0.01, Bex37/218/0.01). Sin embargo, las bajas frecuencias encontradas en los alelos privados de la castaña (frecuencias menores a 1% de la población total) caracterizan a estos alelos como alelos raros, sin sustento como alelos privados, pero originados de un sesgo de muestreo (numero de muestreo reducido entre las localidades).

### BUSQUEDA DE UNA ESTRUCTURACIÓN GENÉTICA

Los resultados del análisis factorial de correspondencia (AFC), muestra que las localidades están débilmente diferenciadas (estructurados) a nivel genético, con una fuerte sobreposición entre ellos. Los valores de inercia para los ejes 1 y 2 explican el 34.48% y 21.55% de la variación respectivamente. Sin embargo se observa (Figura 2) que una parte de los individuos de la localidad de Muymanu se separan claramente (ejes 1 y 2) del resto de individuos, en tanto que individuos de Manuripe muestran una ligera diferenciación (ejes 1 y 3).

El Análisis Espacial de Varianza Molecular SAMOVA indica que el mayor porcentaje de la variación se encuentra dentro de las localidades (valores variaron entre 97.48% en  $K=2$  a 98.2% en  $K=5$ ), y que solo una pequeña fracción se encuentra entre ellas (valores variaron entre 1.33% en  $K=2$  a 2.24% en  $K=4$ ), mostrando bajos porcentajes de diferenciación cualquiera que sea las agrupaciones obtenidas (tabla 3).

Entre pares de localidades (Tabla 4) la mayor diferenciación genética según los valores del índice de fijación y el estimador de diferenciación específica de microsatélites fueron Muymanu y Pariamanu ( $F_{ST} = 0.038$ ,  $***p < 0.001$ ;  $R_{ST} = 0.112$ ,  $**p < 0.01$ ). Mientras que las localidades más relacionadas para ambos índices fueron Valencia y Manuripe ( $F_{ST} = 0.000$ ;  $R_{ST} = 0.000$ ). Además el índice de fijación ( $F_{ST}$ ) señaló que los pares de localidades Piedras-Valencia, Piedras-Manuripe, Pariamanu-Pariamarca no presentan diferenciación genética entre ellos (Tabla 4). Estos pares de poblaciones mostraron una ligera contradicción en cuanto a su diferenciación genética. No en tanto que los valores de  $F_{ST}$  reflejaron una diferenciación genética significativa entre ellos, el  $R_{ST}$  muestra valores bajos y no significativos para los mismos pares. Al contrario de lo observado por Lemes *et al.*, 2003, el  $F_{ST}$  es más sensible a evidenciar una estructuración que el  $R_{ST}$ , probablemente porque

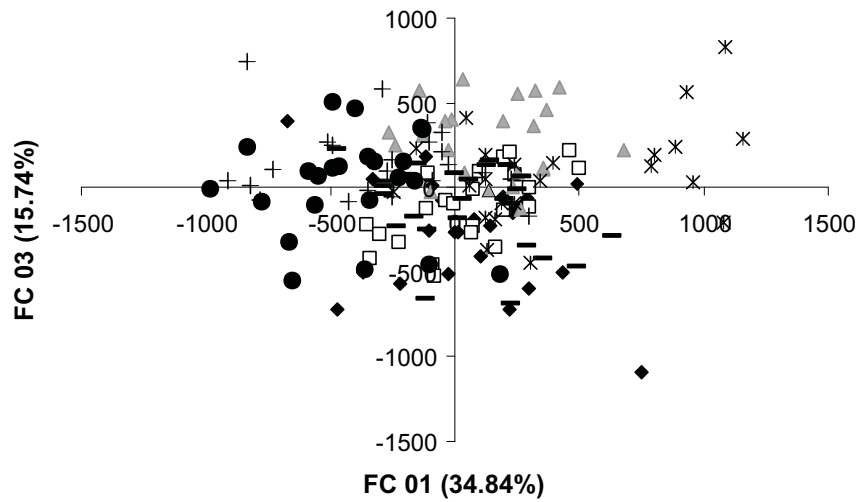
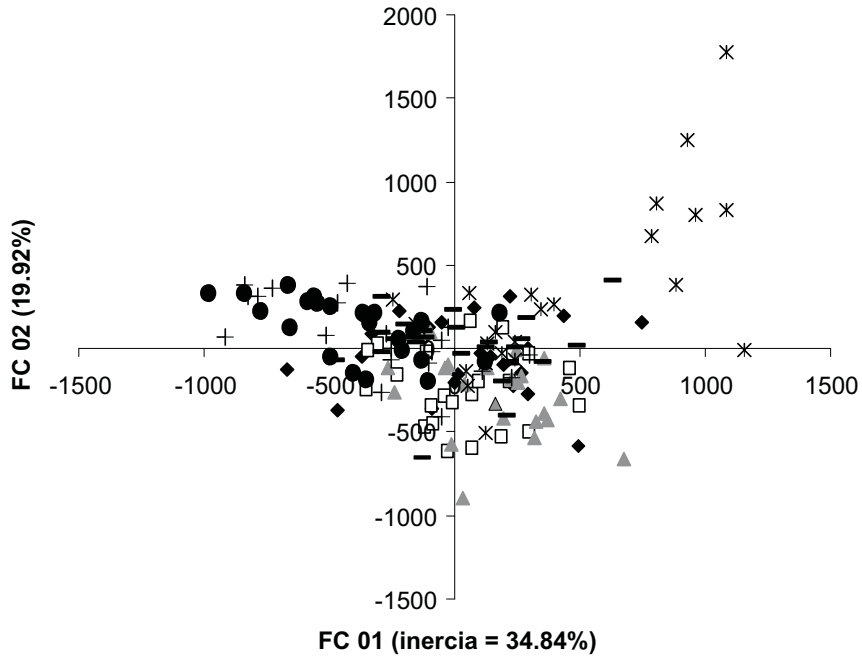
el modelo evolutivo de los microsatélites estudiados no es el modelo "step by step", sino un modelo aleatorio. La poca diferenciación entre las localidades es también corroborada por los resultados de flujo genético (Tabla 5), determinado por el número de migrantes ( $Nm$ ) por generación, que muestra un elevado intercambio de genes entre las localidades. En caso del  $Nm$  basado en el  $F_{ST}$  los  $Nm$  variaron de 6.26 entre Muymanu-Pariamanu al infinito entre los pares de Piedras-Valencia, Piedras-Manuripe, Valencia-Manuripe y Pariamanu-Pariamarca). El  $Nm$  basado en el  $R_{ST}$  varió de 1.97 entre Muymanu-Pariamanu al infinito entre Valencia-Manuripe (Tabla 5).

Las castañas de la región de Madre de Dios hacen parte de una misma población genética (panmixia). Varias razones pueden explicar el flujo genético aleatorio (panmixia) entre estos árboles: la perennidad de los individuos, el sistema de reproducción alogamo, la polinización entomofila, la dispersión por roedores, la topografía poco accidentada, y una zona de estudio muy limitada. La perennidad de los individuos que es una característica de las especies leñosas como la castaña *B. excelsa* (Camargo *et al.*, 1994), que encierran alta variación genética, mayor dentro de las poblaciones que entre ellas, en comparación con otros tipos de plantas (Hamrick *et al.*, 1992).

Un sistema de reproducción alogamo que asegura un gran flujo de genes, combinado con una polinización entomofilia realizada por abejas euglosinas, que son robustos insectos capaces de volar grandes distancias (Tonhasca *et al.*, 2002; Dressler, 1982; Janzen, 1971).

Una dispersión por roedores que juega un importante papel en la propagación de las semillas. Como por ejemplo el majaz (*Agouti paca*) y el añuje (*Dasyprocta variegata*), quienes suelen enterrar los frutos colectados entre 25 a 100 metros de distancia del árbol madre (Zuidema & Boot, 2002; Mori, 1995). Una topografía poco accidentada de la región de Madre de Dios, con pocas barreras geográficas de gran importancia para impedir el flujo de genes entre los árboles relativamente próximos.

Por ultimo una zona de estudio muy limitada en relación a la amplia distribución de la castaña en el sur de la Amazonía continental (Perú, Bolivia y Brasil) que sobrepasa los 120,000 km<sup>2</sup>, abarcando en Bolivia el departamento del Pando, Provincia Vaca Diez (Departamento del Beni) y el norte de Iturrealde (Departamento de la Paz), en Brasil los estados de Acre y Rondonia y en el Perú gran parte del departamento de Madre de Dios. Los aproximadamente 13,789 km<sup>2</sup> analizados en la región de Madre de Dios corresponden a solo una pequeña fracción (11 %) de la distribución total de esta especie en el sur de la Amazonía continental.



- |           |             |                 |            |
|-----------|-------------|-----------------|------------|
| ◆ Piedras | □ Valencia  | ▲ Pampa Hermosa | — Manuripe |
| × Muymanu | ● Pariamanu | + Pariamarca    |            |

**Figura 2.** Representación gráfica de los resultados del Análisis Factorial de Correspondencia (AFC): A = FC 01 Vs FC 02 y B = FC 01 Vs FC 03 inferidos en función a los genotipos encontrados en la castaña *Bertholletia excelsa* proveniente de siete localidades del departamento de Madre de Dios. Los puntos están distribuidos sobre un plano factorial bidimensional.

**Tabla 3.** Análisis espacial de varianza molecular (SAMOVA) calculados a partir de seis locus microsateélites de castaña *Bertholletia excelsa* proveniente de siete localidades del departamento de Madre de Dios.

FUENTE DE VARIACIÓN	G.L.	VARIANZA DE COMPONENTES	PORCENTAJE DE VARIACIÓN	VALOR DE P
<b>k = 2 grupos (Piedras, Valencia, Pampa Hermosa, Manuripe, Pariamanu, Pariamarca) y (Muymanu)</b>				
Entre grupos de poblaciones	1	0.028	1.33	0.141 ± 0.011
Entre poblaciones dentro de los grupos	5	0.025	1.19	0.000 ± 0.000
Dentro de las poblaciones	321	2.039	97.48	0.000 ± 0.000
<b>k = 3 grupos (Piedras, Valencia, Manuripe, Muymanu), (Pariamanu, Pariamarca) y (Pampa Hermosa)</b>				
Entre grupos de poblaciones	2	0.036	1.73	0.013 ± 0.004
Entre poblaciones dentro de los grupos	4	0.005	0.24	0.000 ± 0.000
Dentro de las poblaciones	321	2.039	98.03	0.000 ± 0.000
<b>k = 4 grupos (Piedras, Valencia, Manuripe), (Pariamanu, Pariamarca), (Pampa Hermosa) y (Muymanu)</b>				
Entre grupos de poblaciones	3	0.047	2.24	0.005 ± 0.002
Entre poblaciones dentro de los grupos	3	0.006	0.29	0.000 ± 0.000
Dentro de las poblaciones	321	2.039	98.06	0.000 ± 0.000
<b>k = 5 grupos (Piedras, Valencia, Manuripe), (Pariamanu), (Pariamarca), (Pampa Hermosa) y (Muymanu)</b>				
Entre grupos de poblaciones	4	0.043	2.06	0.024 ± 0.005
Entre poblaciones dentro de los grupos	2	0.005	0.26	0.000 ± 0.000
Dentro de las poblaciones	321	2.039	98.2	0.000 ± 0.000

**Tabla 4.** Índices de  $F_{ST}$  (arriba de la diagonal) y  $R_{ST}$  (debajo de la diagonal), número de migrantes ( $Nm$ ) por generación (en *italico* después del valor de  $F_{ST}$  o  $R_{ST}$ ) calculados a partir de seis loci microsateélites de *Bertholletia excelsa* "castaña" proveniente de siete localidades del departamento de Madre de Dios.

LOCALIDADES	PIEDRAS	VALENCIA	PAMPA HERMOSA	MANURIBE	MUYMANU	PARIAMANU	PARIAMARCA
Piedras	-	0.000 ns /	0.025** / 9.77	0.000ns /	0.020* / 11.98	0.020* / 12.14	0.007 ns / 35.99
Valencia	0.005 ns / 47.24	-	0.018* / 13.95	0.000ns /	0.021* / 11.68	0.029*** / 8.23	0.011* / 23.31
Pampa hermosa	0.046* / 5.13	0.012 ns / 20.31	-	0.020** / 12.05	0.021* / 11.80	0.025** / 9.58	0.014* / 18.43
Manuripe	0.021 ns / 11.64	0.000 ns /	0.012 ns / 20.94	-	0.021* / 11.86	0.027** / 9.13	0.009 ns / 28.22
Muymanu	0.056* / 4.23	0.076** / 3.06	0.069** / 3.39	0.058** / 4.04	-	0.038*** / 6.26	0.025* / 9.65
Pariamanu	0.059** / 3.96	0.046** / 5.16	0.056** / 4.23	0.075*** / 3.08	0.112** / 1.97	-	0.000 ns /
Pariamarca	0.008 ns / 32.30	0.003 ns / 86.93	0.026* / 9.46	0.022* / 10.90	0.055* / 4.31	0.006 ns / 38.34	-

significancia: \*\*\*  $p < 0.001$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*  $p < 0.05$ ; ns = no significativo; Infinito ( ) .



## CONCLUSIONES

Todas las localidades analizadas parecen formar parte de una única población panmictica, probablemente mucho más amplia (lado boliviano y brasilero). La variabilidad genética observada parece estar relacionada a los rasgos de vida de la castaña (perennidad, edad, tiempo de generación, sistema alogamo, modo de dispersión, modo de polinización) y a su demografía todavía alta. Las pequeñas variaciones ( $F_{st}$ ) entre localidades no se detectan al nivel del  $F_{is}$  porque estarían relacionadas a una estructura de emparentados (endogamia) entre los árboles. Todo esto muestra que existe una necesidad de establecer políticas de gestión conjunta entre Perú, Brasil y Bolivia para la conservación y uso sostenido de la castaña en el sur de la Amazonía continental.

## AGRADECIMIENTOS

Al Proyecto Innovación y Competitividad para el Agro Peruano – INCAGRO, por el financiamiento parcial del presente estudio a través del subproyecto “Mejoramiento genético de la castaña (*Bertholletia excelsa*) aplicado al desarrollo regional de Madre de Dios”.

## BIBLIOGRAFÍA CITADA

- Azofeifa-Delgado, A. 2006. Uso de marcadores moleculares en plantas; aplicaciones en frutales del trópico. *Agronomía Mesoamericana*, 17(2): 221-242.
- Belkhir, K.; Borsa, P.; Chichi, I.; Raufast, N.; Bonhomme, F. 2004. GENETIX 4.05.2, logiciel sous windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire génome, populations, interactions, CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II, Montpellier, France.
- Brookfield, J.F.Y. 1996. A simple new method for estimating null frequency from heterozygote deficiency. *Molecular Ecology*, 5: 453-455.
- Boys, J.; Cherry, M.; Dayanandan, S. 2005. Microsatellite Analysis Reveals Genetically Distinct Populations of Red Pine (*Pinus resinosa*, Pinaceae). *American Journal of Botany*, 92(5): 833-841.
- Camargo, P.B.D.; Salomao, R.P.; Trumbore, S.; Martinelli, L.A. 1994. How old are large Brazil-nut trees (*Bertholletia excelsa*) in the Amazon? *Scientia Agricola*, 51: 389-391.
- Chase, M.; Kesseli, R.; Bawa, K. 1996. Microsatellite markers for population and conservation genetics of Tropical Trees. *American Journal of Botany*, 83(1): 51-57.
- Cole, C.T. 2005. Allelic and population variation of microsatellite loci in aspen (*Populus tremuloides*). *New Phytologist*, 167(1): 155-164.
- Dressler, R.L. 1982. Biology of the Orchid Bees (Euglossini). *Annual Review of Ecology and Systematics*, 13: 373-394.
- Doyle, J.J.; Doyle J.L. 1987. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12: 13-15.
- Dupanloup, I.; Schneider, S.; Excoffier, L. 2002. A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations. *Molecular Ecology*, 11: 2571-2581.
- Excoffier, L.; Smouse, P.; Quattro, J.M. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: an application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131: 479-491.
- Frankham, R.; Ballou, J. D. and Briscoe, D. A. 2008. Fundamentos de Genética da Conservação. Sociedade Brasileira de Genética. 280pp.
- Goodman, S.J. 1997. RstCalc: a collection of computer programs for calculating estimates of genetic differentiation from microsatellite data and determining their significance. *Molecular Ecology*, 6(9): 881-885.
- Kalliola, R.; Puhakka, M.; Danjoy, W. 1993. Amazonía Peruana, vegetación húmeda tropical en el llano subandino. Proyecto Amazonía, Universidad de Turku, Turku, Finlandia. 265pp.
- Kanashiro, M.; Harris, S.A.; Simons, A. 1997. RAPD diversity in Brazil nut *Bertholletia excelsa* (Hunb. & Bonpl.: Lecythidaceae). *Silvae Genetica*, 46: 219-223.
- Karp, A.; Kresovich, S.; Bhat, K.V.; Ayad, W.G.; Hodgkin, T. 1997. Molecular tools in plant genetic resources: A guide to the technologies. IPGRI. Rome-Italy.
- Lawrence, A.; Phillips, O.L.; Reategui Ismodes, A.; Lopez, M.; Rose, S.; Wood, D.; Farfan, A.J. 2005. Local values for harvested forest plants in Madre de Dios, Peru: towards a more contextualized interpretation of quantitative ethnobotanical data. *Biodiversity and Conservation*, 14: 45-79.
- Lemes, M.R.; Gribel, R.; Proctor, J.; Grattapaglia, D. 2003. Population genetic structure of mahogany (*Swietenia macrophylla* King, Meliaceae) across the Brazilian Amazon, based on variation at microsatellite loci: implications for conservation. *Molecular Ecology*, 12: 2875-2883.
- Marquardt, P.E.; Epperson, B.Y. 2004. Spatial and population genetic structure of microsatellites in white pine. *Molecular Ecology*, 13: 3305-3315

- Marshall, T., J. Slate, L. Kruk and J. Pemberton. 1998. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Mol. Ecol.*, 7: 639-655.
- Moegenburg, S.M; Levey, D.J. 2002. Prospects for conserving biodiversity in Amazonian extractive reserves. *Ecology Letters*, 5: 320–324.
- Mori, S. A. 1995. La Nuez del Brazil. Institute of Systematic Botany, The New York Botanical Garden, Bronx, New York. Etnobotanica No 5.
- Motta, M. 2002. Reproductive phenology and pollination of the brazil nut tree (*Bertholletia excelsa* Humb. & Bonpl. Lecythidaceae) in Eastern Amazonia. En: Kevan P & Imperatriz Fonseca VL (eds) - Pollinating Bees - The Conservation Link Between Agriculture and Nature - Ministry of Environment / Brasilia. p. 245-254.
- Muir, G.; Lowe, A.J.; Fleming, C.C.; Vogl, C. 2004. High Nuclear Genetic Diversity, High Levels of Outcrossing and Low Differentiation Among Remnant Populations of *Quercus petraea* at the Margin of its Range in Ireland. *Annals of Botany*, 93: 691-697.
- Pastor, S. 2004. Manejo de la Biotecnología Apropiaada para Pequeños Productores: Estudio de Caso – Perú. REDBIO / FAO. Lima – Peru. p. 42-43.
- Peakall, R.; Smouse, P.E. 2005. GenAlEx V6: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. Australian National University, Canberra. Disponible via <http://www.anu.edu.au/BoZo/GenAlEx>.
- Rajesh, M.K.; Nagarajan, P.; Jerard, B.A.; Arunachalam, V.; Dhanapal, R. 2008. *Current Science*, 94(12): 1627-1631.
- Ramírez Chávez, J. 2006. Experiencia de Manejo Sostenible de la Castaña (*Bertholletia excelsa*) el Parque Nacional Bahuaja Sonene y Reserva Nacional Tambopata - Madre de Dios Perú. Boletín IFP Fundación EQUITAS. Especial N°2 | LSJII – Oaxaca.
- Reis A.M.; Braga A.C.; Lemes M.R.; Gribel R.; Collevatti R.G. 2008. Development and characterization of microsatellite markers for the Brazil nut tree *Bertholletia excelsa* Humb. & Bonpl. (Lecythidaceae). *Molecular Ecology Resources*, 9(3): 920-923.
- Slatkin, M. 1985. Rare alleles as indicators of gene flow. *Evolution*, 39: 12.
- Takahashi, T.; Tani, N.; Taira, H.; Tsumura, Y. 2005. Microsatellite markers reveal high allelic variation in natural populations of *Cryptomeria japonica* near refugial areas of the last glacial period. *Journal of Plant Resource*, 118: 83-90.
- Thomson, C.; Chisholm A.; McLachlan, S.; Campbell, J. 2008. Brazil nuts: an effective way to improve selenium status. *The Medical Journal of Medical Nutrition*. 87: 379-84.
- Tonhasca, A. Jr.; Blackmer, J.L.; Albuquerque, G.S. 2002. Abundance and Diversity of Euglossine Bees in the Fragmented Landscape of the Brazilian Atlantic Forest. *Biotropica*. 34(3): 416-422.
- Zuidema, P.; Boot, R. 2002. Demography of the Brazil Nut Tree (*Bertholletia excelsa*) in the Bolivian Amazon: Impact of Seed Extraction on Recruitment and Population Dynamics. *Tropical Ecology*, 18: 1-31.