

# Caracterización molecular con microsatélites amplificados al azar (RAMs) de Inchi (*Caryodendron orinocense* K.)

## Molecular characterization with random amplified microsatellites (RAMs) of Inchi (*Caryodendron orinocense* K.)

*Ana Cruz Morillo-Coronado*<sup>\*</sup>, *Liseth Gómez-Beltrán*<sup>\*\*</sup>, *Iván A. Ávila-Morales*<sup>\*\*\*</sup>,  
*Ernesto Andrade*<sup>\*\*\*\*</sup>, *Yacenia Morillo-Coronado*<sup>\*\*\*\*\*</sup>

DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v17n1.50709

### Resumen

El Inchi o Cacay (*Caryodendron orinocense* Karsten) es una de las especies más promisorias de la Amazonía y la Orinoquia colombiana. El principal producto del Cacay son sus almendras, de las que se extrae un aceite con aplicaciones cosméticas, fitoterapéuticas y alimenticias, además presenta un alto contenido de antioxidantes como los Omega 3, 6 y 9 y Vitaminas como la A y E. No existen estudios sobre la caracterización molecular de este recurso fitogenético, por lo cual el objetivo de esta investigación fue caracterizar la diversidad genética usando marcadores Microsatélites Amplificados al Azar (RAMs). El análisis de similitud al 0.50 formó cuatro grupos de acuerdo al sitio geográfico, siendo los materiales procedentes de Putumayo, Cacayal 19, Pauna y Castilla los de menor similitud. Los valores de heterocigosidad estimada fueron de 0.16 y 0.28 para los cebadores CGA y GT, respectivamente. El porcentaje de loci polimórfico varió entre 55% para el cebador CGA y el 90% para el GT. El valor de *Fst* promedio para los 27 materiales estudiados fue de 0.35, mostrando que la dinámica espacio-temporal de los materiales de *Caryodendron* tienden hacia una diferenciación genética, propio de sus procesos evolutivos e incidencia de la domesticación.

**Palabras clave:** cacay, marcadores moleculares, diversidad genética, flujo genético, domesticación.

### Abstract

The Inchi or Cacay (*Caryodendron orinocense* Karsten) is one of the most promising species of the Amazon and Orinoco Colombian. The main product of Cacay are its almonds, from extracted oil cosmetic, phytotherapeutic and food applications, also has a high content of antioxidants such as Omega 3, 6 and 9 and vitamins like A and E. There are no studies on the molecular characterization of this plant genetic resource; therefore the objective of this research was to characterize the genetic diversity using Random Amplified Microsatellite markers (RAMs). The similarity analysis to 0.50 formed four groups according to geographical location, being materials from Putumayo, Cacayal 19, Pauna and Castilla lowest similarity. Estimated heterozygosity values were 0.16 and 0.28 for the primers CGA and GT, respectively. The percentage of polymorphic loci ranged from 55% for the primer CGA and 90% for the GT. The average *Fst* value for the 27 materials studied was 0.35, showing the space-temporal dynamics of materials *Caryodendron* tend toward genetic differentiation, due to their own evolutionary processes and domestication incidence.

**Key words:** cacay, molecular markers, genetic diversity, genetic flow, domestication.

**Recibido:** septiembre 15 de 2014

**Aprobado:** abril 10 de 2015

\* PhD, Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia (UPTC) Tunja. Colombia.  
Autor para correspondencia: ana.morillo@uptc.edu.co.

\*\* I.A, Universidad de los Llanos, Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales. Meta, Colombia. Km 12 Vía Puerto López. Email: ladgb1228@gmail.com.

\*\*\* I.A, Universidad de los Llanos, Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales. Meta, Colombia. Km 12 Vía Puerto López. Email: ivanavilamorales@hotmail.com.

\*\*\*\* I.A, Universidad de los Llanos, Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales. Meta, Colombia. Km 12 Vía Puerto López. Email: eandrade@unillanos.edu.co.

\*\*\*\*\* PhD, Universidad de los Llanos, Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales. Meta, Colombia. Km 12 Vía Puerto López. E-mail: ymorillo@unillanos.edu.co.

## Introducción

El Inchi (*Caryodendron orinocense* K.), pertenece a la familia *Euphorbiaceae*, de la cual hacen parte alrededor de 60 géneros y cerca de 529 especies, siendo una de las familias más grandes y diversas dentro de las plantas con flores (USDA, 2014). Es conocido en diferentes partes del mundo como Metohuayo (Perú); inchi, cacay, tacay (Colombia); cacay, ñambi, maní de árbol (Ecuador); palo de nuez, nuez de Barquisimeto (Venezuela), Castanha do porco (Brasil). Es una especie originaria de la Amazonía occidental, y se encuentra ampliamente distribuida en la cuenca amazónica en Colombia, Ecuador, Perú y Venezuela (Martínez, 1996). El cacay es un árbol que alcanza entre 15 y 20 m de altura, es una especie rústica, de gran adaptabilidad a suelos ácidos con altos contenidos de aluminio, además se considera una de las especies más promisorias de la región Amazónica y la Orinoquia colombiana (Jaramillo y Jaramillo, 2010).

La producción promedio de árbol adulto es de 250 Kg/año, lo que representa un ingreso familiar de \$200.000/año (Díaz y Ávila, 2002). El Inchi además del uso que tiene su tronco como madera, el cuesco como combustible y la nuez en alimento, su utilización más importante es la producción de aceite a partir de la semilla, convirtiéndose en una excelente planta oleaginosa, compitiendo muy ventajosamente con otras como la palma africana el cual es usado tanto para consumo (Omega 3, 6 y 9) como para la elaboración de cosméticos y productos farmacéuticos (Barrio, 2005; Jiménez y Bernal, 2002). El gran potencial del inchi está dado no sólo por la calidad de su aceite sino por la torta, producto restante de la extracción de las semillas, la cual puede utilizarse en la alimentación animal, ya que contiene alto porcentaje de proteína (43-46%) y minerales como el calcio y el fósforo (Tamayo, 1963).

En cacay, existen pocos estudios acerca de su caracterización morfoagronómica, sólo se reporta los realizados por el Sinchi por Ávila y Cárdenas (2000), quienes evaluaron el germoplasma de cinco especies amazónicas; igualmente se encuentran algunos estudios preliminares realizados por Corpoica aún no publicados. Teniendo en cuenta que el conocimiento de la diversidad genética es necesario para la conservación y el mejoramiento genético de la especie, no se tienen estudios de caracterización genética o molecular ni siquiera en especies a fines como *Caryodendron amazonicum* Ducke, *Caryodendron angustifolium* Stanley y *Caryodendron grandifolium*. Dentro de la familia *Euphorbiaceae* encontramos a el piñón (*Jatropha curcas* L.) y Sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.) como especies productoras también de aceites de alta calidad, y en las cuales se han desarrollado investigaciones encaminadas a la identificación genética de los materiales (Basha et al., 2007; Ganesh et al., 2008; Basha et al., 2009; Jubera et al., 2009; Pamidimarri et al., 2009 a y

b; Subramanyam et al., 2009; Cai et al., 2010; Ikbal et al., 2010; Vargas 2011; Corazon et al., 2009; Rodríguez et al., 2010).

Los marcadores moleculares conocidos como los RAMs también conocidos como ISSR (Intersimple Sequence Repeat) son útiles para medir la diversidad genética en plantas y animales, diferencia entre familias, entre especies y al interior de la especie (Muñoz et al., 2008), muestran la base misma de la variación de los individuos, permiten seleccionar regiones concretas dentro de la molécula de ADN para estudios determinados, el número de polimorfismos detectables es teóricamente ilimitado y permiten analizar tanto la información que se expresa como la que no lo hace (Mahuku et al., 2002; Morillo, 2005). Esta metodología es factible para pequeños laboratorios en términos de equipos y facilidades de costo, no requiere el conocimiento previo de secuencias, no requiere el uso de isótopos radioactivos. Los marcadores obtenidos por los RAMs se pueden usar para estudios de poblaciones (Hantula et al., 1997).

El objetivo de este trabajo de investigación fue caracterizar la diversidad genética de Cacay (*Caryodendron orinocense* K.) usando marcadores Microsatélites RAMs para en un futuro poder proponer estrategias de conservación y mejoramiento genético de la especie.

## Materiales y métodos

### Material vegetal

Se colectaron hojas jóvenes de 29 árboles entre machos y hembras de Inchi (*Caryodendron orinocense* K.) procedentes del departamento del Meta, en los municipios de San Juan de Arama, Lejanías, Cubarral, Guamal, El Castillo, Restrepo y algunos materiales fueron proporcionados por el vivero KAHAI S.A.S (tabla 1). Se incluyó una mayor cantidad de plantas con órganos sexuales femeninos o hermafroditas que aseguren una alta producción de frutos, así como también de buenas características agronómicas y de adaptabilidad.

En la figura 1 se observa la distribución espacial de los árboles de *Caryodendron orinocense* que se utilizaron en este estudio.

### Caracterización molecular

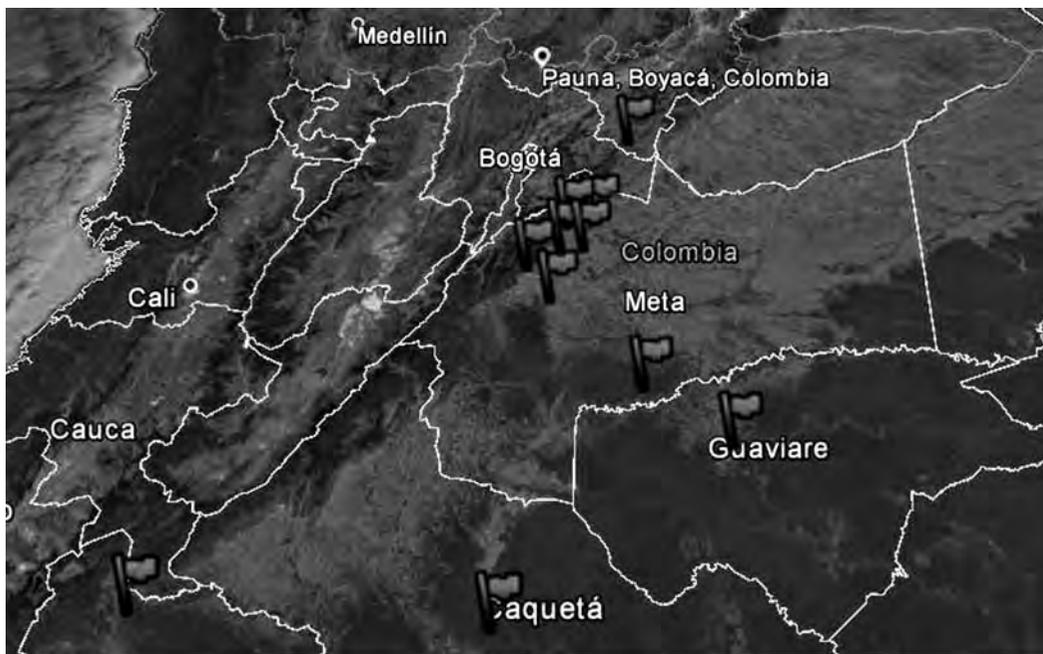
La caracterización molecular de Inchi se llevó a cabo en los laboratorios de biotecnología vegetal y reproducción y genética animal de la Universidad de los Llanos, localizada en Villavicencio, Meta, Colombia; a una altura de 467 msnm y temperatura promedio de 26°C. Para la extracción del ADN se utilizó el protocolo de Dellaporta (1983).

El ADN genómico de las muestras totales se visualizó en geles de agarosa al 0.8%, teñidos con bromuro de etidio en una cámara Maxicell Primo EC-340 Electrofo-

**Tabla 1.** Acciones de *Caryodendron orinocense* utilizadas para la caracterización molecular con microsatélites RAMs.

Nº de Entrada	Colecta	Departamento	Ubicación Georeferenciada	Descripción
1	San Juan de Arama /Alto Curia	Meta	03°23´95"N 73°57´434"O	Árbol nativo hembra (17 años)
2	San Juan de Arama /Alto Curia	Meta	03°23´95"N 73°57´434"O	Árbol nativo macho (17 años)
3	Lejanías/Cacayal	Meta	03°28´458"N 73°54´209"O	Árbol hembra (20-30 años)
4	Lejanías/Cacayal	Meta	03°28´458"N 73°54´209"O	Árbol Macho (20-30 años)
5	Lejanías/Buenos Aires	Meta	03°27´93"N 73°54´396"O	Árbol Macho (63 años)
6	Lejanías/Buenos Aires	Meta	03°27´93"N 73°54´396"O	Árbol Hembra (63 años)
7	Cubarral/Km 1vía al Dorado	Meta	03°47´56"N 73°50´795"O	Tres hembras altamente productivas (40 años)
8	Guamal/La Paz	Meta	03°49´886"N 73°45´267"O	Una hembra (aprox. 30 años)
9	Guamal /Pío XII	Meta	03°49´886"N 73°45´267"O	Un macho (20 años)
10	Guamal /Pío XII	Meta	03°53´59"N 73°47´309"O	Una hembra (aprox. 70 años)
11	Castillo/Santa Cruz	Meta	03°33´459"N 73°45´637"O	Una hembra (aprox. 15 años)
12	Acacias/Santa Teresita	Meta	03°59´130"N 73°42´458"O	Una hembra (aprox.30 años)
13	Montelibano/Acacias	Meta	03°59´253"N 73°48´486"O	Selección Árboles Hembra*
14	Lejanías/Cacayal	Meta	03°28´454"N 73°54´208"O	Selección Árboles Hembra*
16	Morelia	Caquetá	01°26´43.66"N 75°41´153"O	Selección Árboles Hembra*
17	Mocoa	Putumayo	01°5´6.37"N 076°39´24.35"O	Selección Árboles Hembra*
18	Castilla la Nueva/Betania	Meta	03°52.967"N 073°42´358"O	Selección Árboles Hembra*
19	Lejanías/Cacayal	Meta	03°28´486" 073°84´202"O	Selección Árboles Hembra*
20	Santa Teresita/Acacias	Meta	03°59´130"N 73°42´458"O	Selección Árboles Hembra*
21	Castillo/Santa Cruz	Meta	03°33´459"N 073°45´637"O	Selección Árboles Hembra*
22	Pelayo Topo Grande/Pauna	Boyacá	05°39´15.81"N 074°1´17.60"O	Selección Árboles*
23	Puerto Rico	Meta	02°58´9.48"N 073°11´48.79"O	Selección Árboles Hembra*
24	San José del Guaviare	San José del Guaviare	02°34´1.10"N 072°38´32.31"O	Selección Árboles Hembra*
25	Hermafrodita	Meta	4.05788904164, -73.4670889746	Corpoica La Libertad
26	Hembra Corpoica I	Meta	4.05788904164, -73.4670889746	Corpoica La Libertad
27	Hembra Corpoica II	Meta	4.05788904164, -73.4670889746	Corpoica La Libertad
28	Hembra Unillanos	Meta	4°4´30"N 73°35´7"O	Universidad de los Llanos
29	Hembra Unillanos II	Meta	4°4´30"N 73°35´7"O	Universidad de los Llanos

\*KAHAI SAS



**Figura 1.** Posicionamiento geográfico de 29 genotipos de Inchi utilizados para la caracterización molecular.

resis Gel System. Para determinar la concentración de ADN de cada genotipo se hizo una curva de dilución con ADN del bacteriófago Lambda de concentración inicial 20 ng/μl y se llevó a concentraciones finales de 20, 40, 60, 80 y 100 ng/μl. El ADN cuantificado se diluyó en agua tipo HPLC a un volumen total de 100 μl a 10 ng/μl y se almacenó a -20 °C.

Para el análisis RAMs se utilizaron siete cebadores sintetizados por Technologies Inc. (tabla 2). Para la reacción de amplificación con RAMs se preparó el cóctel en un tubo estéril de microcentrífuga (1.5 ml) para un volumen final de 25 μl. La mezcla de reacción se preparó con buffer 1X, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM, DNTPs 0.2 mM, Taq Polimerasa 1U, cebador 2 μM y ADN genómico 10ng.

**Tabla 2.** Cebadores utilizados en la técnica microsátelites RAMs.

Cebador	Secuencia (5´ a 3´)
CCA	DDB(CCA)5
CGA	DHB(CGA)5
GT	VHV(GT)5G
AG	HBH(AG)7A
CT	DYD(CT)7C
TG	HVH(TG)7T
CA	DBDA(CA)7

La amplificación se llevó a cabo en un termociclador PTC 100 Programmable Thermal Controller (MJ. Research, Inc). La desnaturalización inicial fue a 95°C durante 5 min; desnaturalización a 95 °C por 30 seg, hibridación a una temperatura de 50 °C (cebadores AG y CA), 55 °C (cebadores CCA-TG-CT) y 58 °C (cebadores GT-CGA) durante 45 seg, una extensión final de 72 °C por 2 min, 37 ciclos desde la desnaturalización a extensión y por último una extensión a 72 °C durante 7 min. Los productos fueron separados por electroforesis en geles de agarosa al 1.2 % corridos a 90 voltios durante 3 h visualizándose en un transiluminador de luz ultravioleta.

### Análisis estadístico

Se generó una matriz binaria de ausencia (cero) y presencia (uno). La similitud genética entre los individuos se calculó utilizando el coeficiente de similitud de Nei y Li (1979). El análisis cluster se realizó por el método UPGMA y se generó un dendrograma utilizando el paquete estadístico NTSYS (Numerical Taxonomy System for personal Computer, versión 2.02 PC). Para evaluar la diversidad genética se estimó la heterocigosidad insesgada y el porcentaje de loci polimórficos utilizando el paquete estadístico TFPGA (Tools For Population Genetic Analyses, versión 1.3, 1997). Se determinó el f estadístico insesgado con un intervalo de confianza del 95 %.

### Resultados y discusión

De los 29 genotipos de Inchi colectados, dos fueron descartados ya que no se pudo obtener ADN. Los sie-

te cebadores RAMs utilizados para la caracterización molecular de 27 genotipos generaron un total de 85 bandas las cuales contribuyeron en un 90% a la discriminación de los materiales. El número de bandas por iniciador varió de 10 para el cebador CA y 20 para el cebador CGA, con pesos moleculares oscilaron entre 260 y 1500 Kb (tabla 3).

**Tabla 3.** Cebadores utilizados para la caracterización molecular de *Caryodendron orinocense* K, número de bandas totales y polimórficas.

Cebador	No. de bandas totales	No. de bandas polimórficas
CGA	20	11
TG	13	8
GT	18	16
CCA	13	8
CT	11	9
CA	10	9

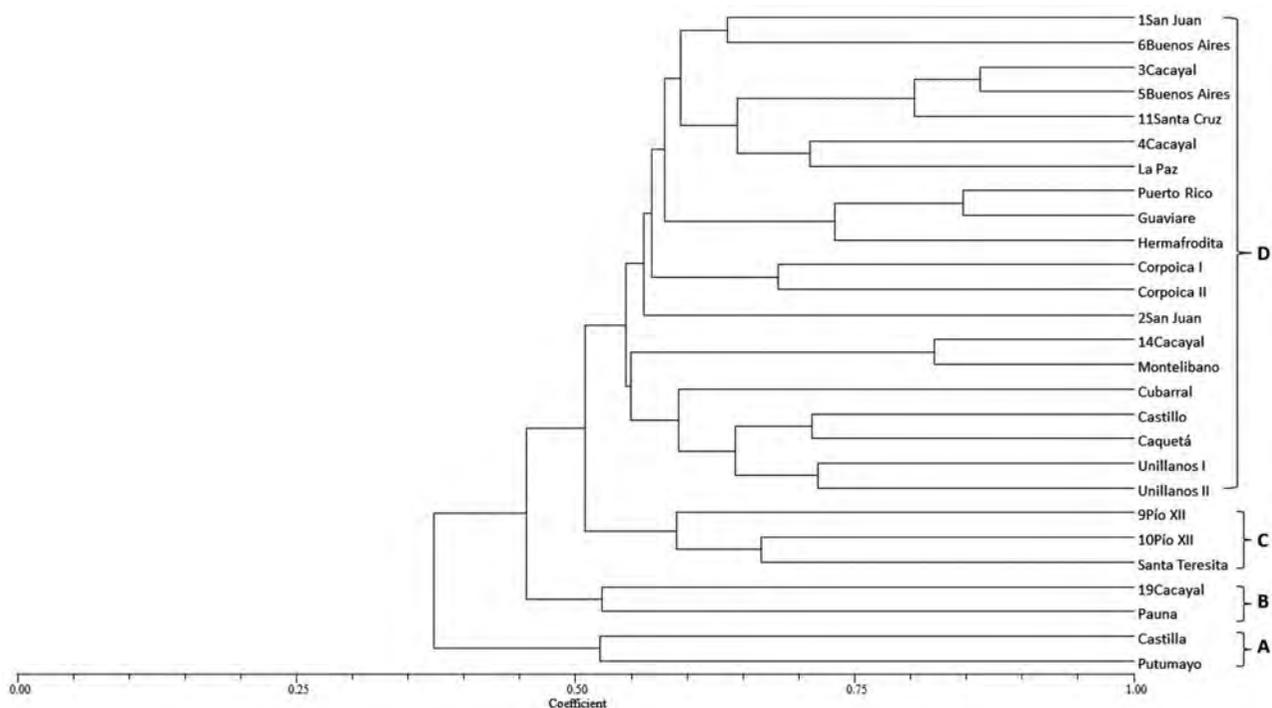
Cuando se compara el número de loci polimórficos (62) encontrados en este estudio con otros trabajos

sobre diversidad genética en especies de la familia *Euphorbiaceae*, como los realizados por Vargas (2011) (73 bandas polimórficas), Basha y Sujatha (2007) (116 bandas polimórficas) y Souza *et al.*, 2009 (27 polimórficas) en *Jatropha curcas* L, el número de bandas encontrado luce adecuado para la estimación de los parámetros genéticos en Inchi. El cebador GT fue el que mayor aporte hizo a la variación genética observada, lo que significa que puede ser útil para evaluar la diversidad genética en materiales de *Caryodendron*.

El análisis mediante el coeficiente de Nei-Li, a un nivel de similaridad de 0.50, dividió la población en 4 grupos (A, B, C, D) (figura 2).

Los grupos A y B que incluyen los materiales de Putumayo, Castilla, Pauna y Cacayal 19 son los que presentan el menor valor de similaridad (0.50) con respecto de los demás grupos formados, esto se puede evidenciar en las características propias de estos materiales tales como tamaño del fruto, color del fruto, tamaño de la hoja, tamaño y color de la nuez según observaciones realizadas por la empresa KAHAI S.A.S

Como puede observarse el grupo D reúne el mayor número de los materiales que fueron colectados en el departamento del Meta junto con los materiales de Guaviare y Caquetá, y presenta un índice de similaridad superior a 0.70, lo que permite evidenciar una



**Figura 2.** Dendrograma de la estructura genética de 27 individuos de *Caryodendron orinocense* K, basado en el Coeficiente de Similaridad de Nei-Li, y calculado de los datos combinados de los siete cebadores Microsatélites RAMs, con el método de clasificación UPGMA, usando los programas SAHN y TREE de NTSYS-pc Versión 1.8.

baja variabilidad genética entre los individuos, la cual puede deberse al flujo genético, al transporte de material vegetal y al origen uniparental (FAO, 2002). Los materiales de Pío XII identificados con los números 9 y 10, y Santa Teresita que conformaron el grupo C presentan características similares en cuanto a su composición genética y morfológica, esto puede explicarse por su cercanía geográfica, ya que Guamal y Acacias son municipios con una distancia menor a los 20 km.

En términos generales, el análisis molecular agrupó a los materiales de *Caryodendron orinocense* de acuerdo a su distribución geográfica, evidenciando que los materiales procedentes de Putumayo y Boyacá (Pauna) presentan menos similaridad genética con el resto de los materiales evaluados, en tanto que los materiales de Guaviare y Caquetá se agruparon con los materiales del departamento del Meta. Esto puede explicarse al transporte de material vegetal entre estos dos departamentos y la polinización cruzada (flujo génico) entre plantas de un mismo origen geográfico.

Los valores de heterocigosidad estimada estuvieron en un rango comprendido entre 0.16 y 0.28 para los cebadores CGA y CT, respectivamente. El porcentaje de loci polimórfico varió entre 55% para el cebador CGA y el 90% para el CT (tabla 4).

**Tabla 4.** Heterocigosidad estimada y porcentaje de loci polimórficos de cada uno de los cebadores utilizados para la caracterización de la diversidad genética en *Caryodendron orinocense*.

Cebador	Nº Loci	He Estimado	% Loci Polimórficos (95%)
CGA	20	0.16	55.00
CCA	13	0.22	61.54
CT	11	0.28	90.00
CA	10	0.26	81.82
TG	13	0.22	69.23
GT	18	0.24	88.89
<b>Población Total</b>	85	0.2259	72.94

Estudios realizados por Vargas (2011) en la identificación de la diversidad genética en *Jatropha* usando diez marcadores ISSR encontró un porcentaje de polimorfismo promedio de 34%, el cual es similar al observado en otros trabajos en *Jatropha* como los realizados por Basha y Sujetha (2007) quienes evaluaron 42 accesiones con marcadores RAPD e ISSR encontrando un 42% de polimorfismo y una moderada diversidad genética; Reddy et al. (2007) utilizando RAPD

y AFLPs en 23 materiales obtuvieron un 15 y 9% de polimorfismo respectivamente, concluyendo que la diversidad genética es baja coincidiendo con las investigaciones realizadas por Sun et al. (2008). Sin embargo; otros estudios muestran la existencia de moderada a alta diversidad genética en *Jatropha* con porcentajes de polimorfismos que van desde 35 al 98% (Ganesh et al., 2008; Gupta et al., 2008; Pamidimarri et al., 2009a; Senthil Kumar et al., 2009; Basha et al., 2009; Singh et al., 2010; Tatikonda et al., 2009; Cai et al., 2010). Estudios realizados por Corazon-Guivin (2009), en la caracterización genética de accesiones Sanmartinenses del banco nacional de germoplasma de Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis* L), muestran un porcentaje de loci polimórficos de 60.87%, por lo que los resultados de esta investigación se encuentran dentro de los resultados obtenidos en los estudios realizados en la familia de las *Euphorbiaceae*.

El valor de *Fst* promedio para los 27 materiales estudiados fue de 0.35, con una desviación estándar de 0.07, según Wright (1978) valores por encima de 0.25 muestran diferenciación genética. El *Fst* encontrado en este estudio es un parámetro importante puesto que ayuda a entender la dinámica espacio-temporal de los materiales de *Caryodendron*, así como la estructura de cruzamientos entre ellos. Para efectos comparativos, Nason (2002) plantea que en concordancia con la alta tasa de exogamia y la dispersión de polen a largas distancias que parecen caracterizar las poblaciones de árboles neotropicales, dichas poblaciones presentan una diversidad relativamente alta y un grado de diferenciación genética relativamente bajo, aún en poblaciones que se encuentran a kilómetros de distancia.

Sin embargo; en la especie estudiada a pesar de ser alógama, presenta un alto grado de polinización entre individuos emparentados lo que resulta en una diversidad genética baja y un índice de diferenciación genética (*Fst*) alto. En el género *Plukenetia* (*Euphorbiaceae*) Rodríguez et al., (2010) realizó estudios de diferenciación morfológica y molecular usando marcadores ISSR, encontrando valores de *Fst* entre 0.89 y 0.98, con lo cual se evidenció un alto grado de diferenciación entre las accesiones estudiadas. Sin embargo, es importante tener en cuenta que para estudiar la genética de poblaciones y su grado de estructuración, es indispensable tener poblaciones estructuradas y con un suficiente número de individuos y realizar evaluaciones en el tiempo que permitan sacar conclusiones del flujo genético y la dinámica poblacional.

El mayor grado de polimorfismo e información genética aportados por la técnica RAMs puede ser complementado con información proveniente de la caracterización morfológica y bioquímica, y así poder elucidar en una forma más clara las intrincadas relaciones e interacciones que se presentan en la mayoría de los materiales y evaluar la diversidad intraespecífica de ellos en una escala mucho más fina.

## Conclusiones

Los marcadores RAMs permitieron determinar la variación genética existente en los materiales de *Caryodendron orinocense* evaluados agrupándolos de acuerdo al sitio geográfico donde fueron colectados.

Se determinó que existe poca variabilidad genética debido a los procesos de reproducción uniparental, sin embargo estos materiales presentan diferenciación genética dado por los procesos de domesticación y evolución a la que están sometidos los materiales constantemente.

## Agradecimientos

Los autores agradecen la colaboración de Kahai S.A.S, Centro de Investigación Corpoica La Libertad, Laboratorio de biotecnología vegetal y reproducción y genética animal y a la Dirección General de Investigaciones de la Universidad de los Llanos. Este trabajo de investigación fue seleccionado en la "Convocatoria para apoyar financieramente la ejecución de Proyectos de Investigación de grado año 2012", por la Dirección General de Investigaciones de la Universidad de los Llanos.

## Referencias bibliográficas

Ávila, G., y Cárdenas, J. (2000). Clasificación y caracterización morfoagronómica del germoplasma de cinco especies frutales amazónicas. Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas. SINCHI. Santafé de Bogotá. 28p.

Barrios, H. (2005). *Sacha. La gran revolución de las grasas* (The Big Fat Revolution), 28, Norma (ed). Recuperado de <http://la gran tierra.com>.

Basha, S. D., Francis, G., Makkar, H. P. S., Becker, K., y Sujatha, M. (2009). A comparative study of biochemical traits and molecular markers for assessment of genetic relationships between *Jatropha curcas* L. germplasm from different countries. *Plant Science*, 176(6), 812-823.

Basha, S. D., y Sujatha, M. (2007). Inter and intra-population variability of *Jatropha curcas* (L.) characterized by RAPD and ISSR markers and development of population-specific SCAR markers. *Euphytica*, 156(3), 375-386.

Cai, Y., Sun, D., Wu, D., y Peng, J. (2010). ISSR-based genetic diversity of *Jatropha* germplasm in China. *Biomass and Bioenergy*, 34(12), 1739-1750.

Corazon, M., Castro, D., Chota, W., Rodríguez, A., Cachique, D., Manco, E., Del-Castillo, D., Renno, J., y García, C. (2009). Caracterización genética de accesiones Sanmartinenses del Banco Nacional de germoplasma de Sacha Inchi *Plukenetia volubilis* L. (E.E. El Porvenir-INIA). *Folia Amazónica*, 18(1-2), 23-31.

Dellaporta, S.L., Wood, J., y Hicks, J.B. (1983). A plant DNA miniprep: Versión II. *Plant Mol Biol Rep*, 1(4), 19-21.

Díaz, J. A., y Ávila, L. M. (2002). *Sondeo del mercado mundial de Inchi (Caryodendron orinocense)*. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt, Bogotá, Colombia. 16 pp.

FAO, (2002). Estudio FAO, Montes 44/3. *Especies forestales productoras de frutas y otros alimentos*. Ejemplos de América Latina. 245 pp.

Ram, S. G., Parthiban, K. T., Kumar, R. S., Thiruvengadam, V., & Paramathma, M. (2008). Genetic diversity among *Jatropha* species as revealed by RAPD markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 55(6), 803-809.

Gupta, S., Srivastava, M., Mishra, G. P., Naik, P. K., Chauhan, R. S., Tiwari, S. K., ... & Singh, R. (2008). Analogy of ISSR and RAPD markers for comparative analysis of genetic diversity among different *Jatropha curcas* genotypes. *African Journal of Biotechnology*, 7(23), 4230-4243.

Hantula, J., Dusabenyagasani, M., y Hamelin, R. (1997). Random Amplified Microsatellites (RAMs) a novel method for characterizing genetic variation within fungi. *European Journal of Forest Pathology*, 26(3), 159-166.

Ikbali, K., y Dhillon, R. (2010). Evaluation of genetic diversity in *Jatropha curcas* L. using RAPD markers. *Indian Jour. Biotech*, 9(1), 50-57.

Jaramillo, A., y Jaramillo, C. (Junio de 2010). *El Inchi una alternativa económica para Colombia*. En: Memorias del VII Seminario Internacional de Frutas Tropicales. Agroindustria e Innovación, Medellín, Colombia. 64p.

Jiménez, C.; H. Bernal. (2002). El inchi (*Caryodendron orinocense* Karsten). La oleaginosa más promisoría de la subregión andina. 2 ed. SECAB. Ministerio de Educación y Ciencia. España. Corporación Andina de Fomento. 429pp.

Jubera, M., Janagoudar, B., Biradar, D., Ravikumar, R., Koti, R., y Patil, S. (2009). Genetic diversity analysis of elite *Jatropha curcas* L. genotypes using randomly amplified polymorphic DNA markers. *Karnataka Journal of Agricultural Sciences*, 22(2), 293-295.

Martínez, S.J.B. (1996). El Inchi *Caryodendron orinocense* Karst. Oleaginosa nativa de América Tropical. Departamento de Fitotecnia, Facultad de Agronomía Universidad de Nariño. Pasto. Colombia. 52 p.

Mahuku, G.S., Henríquez, M. A., Muñoz, J.E., y Buruchara, R.A. (2002). Molecular markers dispute the existence of the Afro-Andean group of the Bean Angular Leaf Spot pathogen, *Phaeoisariopsis griseola*. *Phytop*, 96(6), 580-589.

Morillo, A., Morillo, Y., Zamorano, A., Vásquez, H., y Muñoz, J. E. (2005). Caracterización molecular con microsatélites aleatorios (RAMs) de la colección de mora *Rubus* spp, de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Palmira. *Acta Agron*, 54(2), 15-24.

Muñoz, J. E., Morillo, C. A., y Morillo, C. Y. (2008). Microsatélites Amplificados al Azar (RAM) en estudios de diversidad genética vegetal. *Acta Agron*, 57(4), 219-226.

Nei, M., y Li, W.H. (1979). Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc Nat Acad Sci*, 79(10), 5267-5273.

Nason, J. (2002). La estructura genética de árboles. En: Ecología en Conservación de bosques Neotropicales. Guariguata, M.R y G.H, Catan, Editores. Libro universitario regional (EULAC-GTZ), Costa Rica, 631p.

Pamidimarri, D.V.N.S., Sinha, R., Kothari, P., y Reddy, M. P. (2009a). Isolation of novel microsatellites from *Jatropha curcas* L. and their cross-species amplification. *Molecular Ecology Resources*, 9(1), 431-433.

Pamidimarri, D.V.N.S., Mastan, S.G., Rahman, H., y Reddy, M.P. (2009b). Molecular characterization and genetic diversity analysis of *Jatropha curcas* L. in India using RAPD and AFLP analysis. *Mol. Biol. Repor*, 37(5), 2249-2257.

Reddy, M.P., Chikara, J., Patolia, J., y Ghosh, A. (2007). Genetic improvement of *J. curcas* adaptability and oil yield. In: *Fact Seminar on J. curcas* L., *Agronomy and Genetics*, 26-28 March 2007, Wageningen, The Netherlands, Published by FACT Foundation.

Rodríguez, A., Corazon-Guivin, M., Cachique, D., Mejía, K., Del Castillo, D., Renno, J.F., y García-Dávila, C. (2010). Diferenciación morfológica y por ISSR (Inter simple sequence repeats) de especies del género *Plukenetia* (Euphorbiaceae) de la Amazonía peruana: propuesta de una nueva especie. *Rev. Peru Biol*, 17(3), 325-330.

Senthil, K.R., Parthiban, K.T., y Govinda, R. (2009). Molecular characterization of *Jatropha* genetic resources through inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. *Mol.Biol.Rep*, 36(7), 1951-1956.

Singh, P., Singh, S., Mishra, S.P., y Bhatia, S.K. (2010). Molecular Characterization of Genetic Diversity of *Jatropha curcas* L. *Genes. Genomes. Genomics*, 4(1), 1-8.

- Souza, D., Moreira, G.; Guimarães, J.; Librelon, S., Fernandes, T.; Nietsche, S., y Costa, M. (2009). Análise da diversidade genética intrapopulacional de pinhão-mansô (*Jatropha curcas* L.) com marcadores ISSR. Unimontes, BR.p 7. In: Congresso Brasileiro de Plantas Oleaginosas, Óleos, Gorduras E Biodiesel, 6. Montes Claros. Biodiesel: inovação tecnológica-anais. Lavras: UFLA, 2009.
- Subramanyam, K., Muralidhararao, D., y Devanna, N. (2009). Genetic diversity assessment of wild and cultivated varieties of *Jatropha curcas* (L.) in India by RAPD analysis. *African Journ. Biotech*, 8(9), 1900-1910.
- Sun, Q., Lib, L., Lib, Y., Wua, G., y Ge, X. (2008). SSR and AFLP markers reveal low genetic diversity in the biofuel plant *Jatropha curcas* in China. *Crop. Scien*, 48(5): 1865-1871.
- Tamayo, F. (1963). *Plantas comestibles poco conocidas como tales*. *Rev. Fac. Agron.* (Maracay), 3(1), 5-10.
- Tatikonda, L., Wani, S., Kannan, S., Beerelli, N., Thakur, K.S., Hoisington, D., Prathibha, D., y Varshney, R. (2009). AFLP-based molecular characterization of an elite germoplasm collection of *Jatropha curcas* L, a biofuel plant. *Plant. Scien*, 176(4), 505-513.
- USDA. (2014). *Classification for Kingdom Plantae Down to Family Euphorbiaceae*. Recuperado de <http://plants.usda.gov/java/Classification>.
- Vargas, P.R. (2011). Análisis de la diversidad genética de 21 accesiones de piñón (*Jatropha curcas* L.) utilizando marcadores de tipo ISSR (Inter-microsatélites). (Tesis de pregrado). *Escuela Agrícola Panamericana, Honduras*. 26 p.
- Wright, S. (1978). Evolution and the genetics of populations. Variability within and among natural populations, Vol. 4. Editor University of Chicago, press. IL, USA. 590 pp.