

Caracterización isoenzimática de seis poblaciones de *Annona cherimola* Mill. de la Región La Libertad, Perú

Isoenzymic characterization of six populations of *Annona cherimola* Mill. from La Libertad Region, Peru

Fátima Zavala, Radigud Fernández, Edgardo Polo, Fernando Valderrama

Universidad Nacional de Trujillo,
Facultad de Ciencias Biológicas.
Ciudad Universitaria, Av. Juan Pablo II S/N. Trujillo, Perú. Email Fátima Zavala: fazadlc@yahoo.com.mx; Email Radigud Fernández: radifer41@hotmail.com; Email Edgardo Polo: edgardopb_1010@hotmail.com; Email Fernando Valderrama: fvlc_1@hotmail.com

Resumen

La presente investigación tuvo por objetivo caracterizar isoenzimáticamente a seis poblaciones de *Annona cherimola* de la Región La Libertad. Muestras de hojas tiernas de árboles con al menos dos fructificaciones fueron colectadas de las localidades de La Cuesta, Paday, Samne, Cascas, Poroto y Trujillo. Los perfiles electroforéticos de las enzimas PGI, APCH, MDH y ME fueron analizadas y procesadas. Encontramos polimorfismo sólo para los loci Pgi-1 y Me con siete y dos alelos respectivamente; valores promedio para polimorfismo de 0,40 y heterocigosidad media entre 0,206 (La Cuesta) y 0,285 (Poroto). Los resultados indican que existe una alta variabilidad fenotípica y genotípica en las seis poblaciones de *Annona cherimola* de la Región La Libertad.

Palabras clave: *Annona cherimola*, isoenzimas, germoplasma, La Libertad.

Abstract

The aim of this study was to determinate the isozymic characteristic of six *Annona cherimola* populations from La Libertad Region. Leaves of trees with at least two fructifications were collected in six localities: La Cuesta, Paday, Samne, Cascas, Poroto and Trujillo. The samples were processed and the electrophoretic profiles of the enzymes PGI, APCH, MDH and ME were analyzed. We found polymorphism for the loci PGI-1 and ME, with seven and two alleles respectively, average values of 0,40 for polymorphism and mean heterozygosity between 0,206 (La Cuesta) and 0,285 (Poroto). There is high phenotypic and genotypic variability in six *Annona cherimola* populations in La Libertad Region.

Keywords: *Annona cherimola*, isoenzymes, germplasm, La Libertad.

Presentado: 04/08/2009
Aceptado: 19/11/2009
Publicado online: 12/01/2010

Introducción

Annonaceae es una familia que en la actualidad tiene una distribución pantropical con aproximadamente 236 especies en el Perú y 44 endemismos (Leon 2006). Una de la especies más importantes es *Annona cherimola* Mill., la chirimoya, originaria de los valles interandinos, entre los 1500 y 2200 m de altitud, del sur de Ecuador y norte del Perú (Morales et al. 2004, Cautín y Agustí 2005). Su domesticación y utilización en el Perú datan de épocas pre-hispanicas (Bonavia et al. 2004). En la actualidad *A. cherimola* es una especie comercial con distintos cultivares y variedades en Chile, Bolivia, México, Centroamérica Estados Unidos, Antillas, Argentina, África Central, Indochina, Islas Canarias, Madera, Argelia, Egipto e Israel y en España el actual primer productor mundial de frutos de chirimoyas (Pinto et al. 2005).

En el Perú existen cerca de 1600 hectáreas de plantaciones de chirimoya distribuidas en las serranías de Lima, Cajamarca, Ancash, Piura, Lambayeque, Huánuco las que concentran la mayor producción (11,116 toneladas métricas anuales desde el año 1994 hasta la actualidad, MINAG 2006). En La Libertad este frutal es cultivado en huertos familiares de diferentes distritos representando sólo el 5,4% de la producción peruana en el año 2005 (MINAG 2006).

Diferentes estudios han mostrado que las hojas, corteza, semillas y raíz de *Annona cherimola* poseen compuestos activos como ciclopéptidos (Wele et al. 2005), heptapéptidos (Wele et al. 2004), alcaloides (Chen et al. 2001; Chung-Yi et al. 2001) y acetogeninas (Kim et al. 2001, Woo et al. 2000, 1999, Chen et al. 1999) con notable efecto citotóxico en líneas celulares tumorales (Quispe et al. 2007) y en larvas de *Ceratitis capitata* (Martin et al. 2000) y *Aedes aegypti* (Bobadilla et al. 2002) atribuyéndose esta propiedad a su capacidad inhibitoria del transporte de electrones a nivel del complejo I (NADH ubiquinona oxidoreductasa) mitocondrial (Xu et al. 2002; Degli et al. 1994; Londershausen et al. 1991).

La diversidad de las Annonaceae se debe a su naturaleza hermafrodita (dicogámica-protogámica) y a su regeneración natural por semillas (Bridg 2000). Para el adecuado manejo y producción de la chirimoya Samuel et al. (1991) propusieron el estudio de las aloenzimas como un medio para comprender la diversidad y sistemática de Annonaceae. Posteriormente Escribano et al. (2004) estudiaron marcadores moleculares en microsatélites. Morales et al. (2006) señalan la impresionante variabilidad genética de verdaderos bosques en estado silvestre de *A. cherimola* al sur de Ecuador. A pesar de la diversidad de germoplasma encontrado en Ecuador y Perú, en estos países son considerados cultivos subutilizados (en Perú se comercializan las variedades Chiuna y Cumbe) (Vanhove y Van Damme 2008)

En el presente trabajo se caracterizan isoenzimáticamente a seis poblaciones de *Annona cherimola* de La Libertad y se establecen las frecuencias génicas y genotípicas evaluando cuatro sistemas enzimáticos.

Material y métodos

Área de estudio. Tomando en consideración el buen estado fitosanitario de árboles y frutos, se eligieron para colecta, hojas tiernas de 30 ejemplares de los lugares elegidos, tomando en cuenta la similaridad de características, debido a la inexistencia de variedades establecidas en las plantaciones de las seis localidades:

- Provincia de Trujillo: (1) Distrito de Poroto; 485 m de altitud, 8°00'59,81"S y 78°46'00,18"W. (2) Este de la ciudad de Trujillo, distritos de Florencia de Mora y El Porvenir; 85 y 90 m, respectivamente, 8°07'46,34"S y 78°57'39,75"W.

- Provincia de Otuzco: (3) Distrito de Samne; 1417 m, 7°58'39,17"S y 78°40'56,67"W. (4) Caserío de Paday (Distrito de Plazapampa); 1801 m, 7°57'31,99"S y 78°37'19,71"W. (5) Distrito de La Cuesta; 1874 m, 7°55'00,55"S y 78°42'58,53"W.

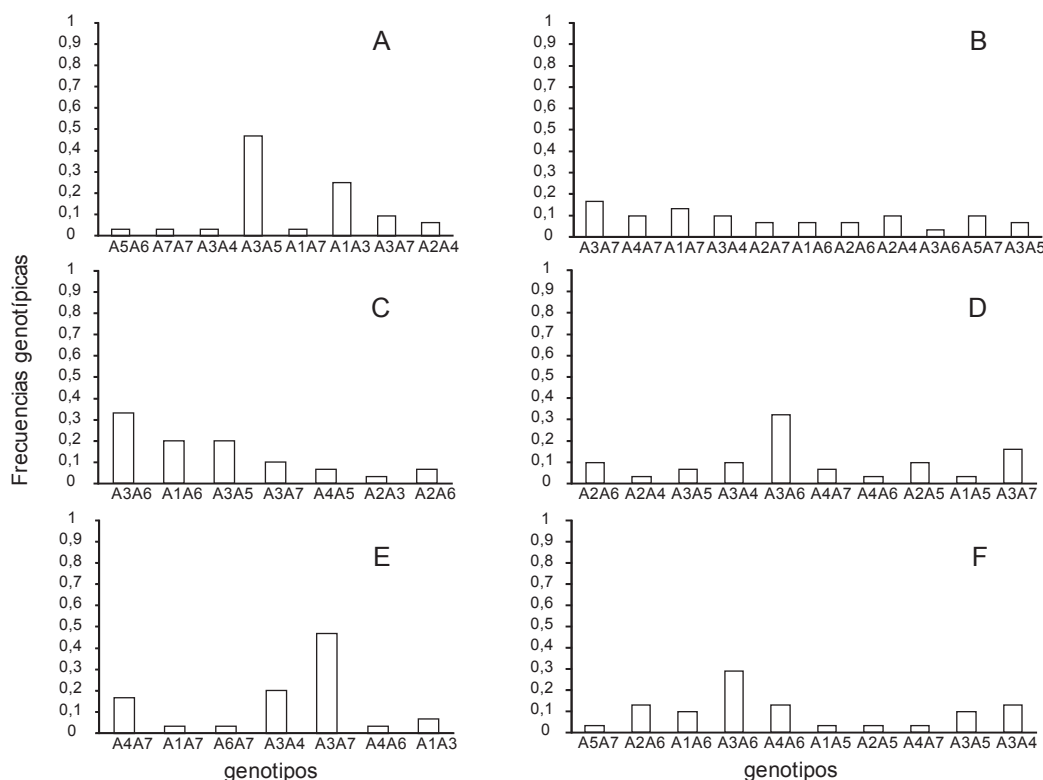


Figura 1. Distribución de genotipos y frecuencias genotípicas para el gen Gpi-1 de *Annona cherimola* en la población de La Cuesta(A), Paday (B), Samne (C), Cascas (D), Poroto (E) y Trujillo (F) de la Región La Libertad, junio 2006-diciembre 2007.

- Provincia de Gran Chimú: (6) Distrito de Cascas (Sector El Platanar); 1274 m, 7°29'00.00"S y 78°49'00.00"W.

Obtención de muestras de hojas de *A. cherimola*. Hojas jóvenes de 1 a 2 cm de longitud fueron recolectadas de árboles en fructificación, introducidas en viales conteniendo tampón de extracción, etiquetadas y colocadas en hielo para su traslado al laboratorio de Genética de Poblaciones donde fueron mantenidas a -20 °C para conservar la actividad y resolución isoenzimática (Perfectti y Pascual 1996).

Extracción enzimática y homogenización. Aproximadamente 500 mg de hoja fueron trituradas en un mililitro de tampón de extracción (Perfectti y Pascual 1996); y sobre cada muestra homogenizada se colocaron pequeños recortes de papel Whatman N° 3 (11 x 5 mm) para absorber las enzimas. Las enzimas fueron sometidas a electroforesis en geles de almidón. Todo el proceso se realizó a 4 °C.

Electroforesis horizontal en geles de almidón. Se empleó almidón de papa hidrolizado para electroforesis (Sigma Chemical Co.) y el sistema tampón LiOH (Perfectti y Pascual 1996). Todos los geles fueron preparados siguiendo la propuesta de Soltis teste Perfectti y Pascual (1996) a una concentración del 10% de almidón; para ello se utilizaron 350 mL de tampón gel y 35 g de almidón hidrolizado. Ambos componentes se calentaron en un matraz, agitando continuamente, hasta ebullición e inmediatamente se agregó sobre el molde de gelificación previamente desengrasado con alcohol.

Como moldes de gelificación se emplearon marcos de metacrilato (230 x 230 mm dimensiones exteriores; 190 x 120 mm de dimensiones interiores) sobre láminas de vidrio (230 x 230 x 1,5 mm); luego de una hora se cubrió con una película de plexiglás, para evitar la deshidratación del gel y se conservó en el refrigerador por 24 horas para su utilización posterior.

Carga de muestras. Previamente a la colocación de las muestras en el gel se efectuó un corte transversal a dos centímetros de su extremo catodal; luego se insertó al inicio del extremo izquierdo del gel un recorte de papel de filtro con azul de bromofenol (diluído en agua al 1%) como indicador del desarrollo del corrido electroforético y enseguida, de manera secuencial, se colocaron los papeles de filtro embebidos en el extracto (Perfectti y Pascual 1996).

Desarrollo de la electroforesis. Se emplearon cámaras de electroforesis con una capacidad de 500 mL usando como fuente de alimentación el modelo Sigma P500B. Los geles se situaron sobre cubetas de aluminio conteniendo hielo conectadas a un circuito refrigerante que las mantuvo entre 2 y 3 °C; a los 15 minutos de iniciarse el primer corrido, se retiraron los papeles de las muestras y se restablecieron las condiciones eléctricas preliminares durante nueve horas, tiempo aproximado para que el frente de azul de bromofenol alcance los 1 ó 2 cm del extremo anodal, circunstancia en la que se detuvo el corrido electroforético. El gel fue inmediatamente cortado en láminas horizontales de aproximadamente 2—3 mm de grosor para su tinción.

Tinción. Siguiendo la metodología de Soltis teste Perfectti y Pascual (1996), las tinciones para las enzimas fosfoglucoasa isomerasa (PGI) (EC 5.3.1.9), fosfatasa ácida (APCH) (EC 3.1.3.2), malato deshidrogenasa (MDH) (EC 1.1.1.37) y enzima mállica (ME) (EC 1.1.1.40) se llevaron a cabo en bandejas de vidrio empleando una solución caliente de agarosa (40 °C). El tiempo de incubación para todas las enzimas fue aproximadamente de 30 minutos a 37 °C. El gel fue inmediatamente fotografiado y posteriormente sumergido en fijador Carnoy's para su conservación.

Análisis de los zimogramas. Con los resultados del análisis directo y de las fotografías de los geles coloreados se elaboraron los zimogramas, a partir de los cuales se identificaron y

Tabla 1. Frecuencias genotípicas para el locus Gpi-1 de la enzima fosfoglucoasa isomerasa en seis poblaciones de *Annona cherimola* de la Región La Libertad, junio 2006-diciembre 2007.

	Poblaciones						
	Genotipo	La Cuesta	Paday	Samne	Cascas	Poroto	Trujillo
Genotipos comunes	A ₁ A ₃	0,250	0,000	0,000	0,000	0,067	0,000
	A ₁ A ₅	0,000	0,000	0,000	0,032	0,000	0,032
	A ₁ A ₆	0,000	0,067	0,200	0,000	0,000	0,098
	A ₁ A ₇	0,031	0,133	0,000	0,000	0,033	0,000
	A ₂ A ₄	0,063	0,100	0,000	0,032	0,000	0,000
	A ₂ A ₅	0,000	0,000	0,000	0,097	0,000	0,032
	A ₂ A ₆	0,000	0,067	0,067	0,097	0,000	0,129
	A ₃ A ₄	0,031	0,100	0,000	0,097	0,200	0,129
	A ₃ A ₅	0,469	0,067	0,200	0,065	0,000	0,098
	A ₃ A ₆	0,000	0,033	0,333	0,323	0,000	0,290
	A ₃ A ₇	0,094	0,167	0,100	0,161	0,467	0,000
	A ₄ A ₆	0,000	0,000	0,000	0,032	0,033	0,129
	A ₄ A ₇	0,000	0,100	0,000	0,065	0,167	0,032
	A ₅ A ₇	0,000	0,100	0,000	0,000	0,000	0,032
	Genotipos únicos	A ₅ A ₆	0,031	0,000	0,000	0,000	0,000
A ₇ A ₇		0,031	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
A ₂ A ₇		0,000	0,067	0,000	0,000	0,000	0,000
A ₄ A ₅		0,000	0,000	0,067	0,000	0,000	0,000
A ₂ A ₃		0,000	0,000	0,033	0,000	0,000	0,000
A ₆ A ₇		0,000	0,000	0,000	0,000	0,033	0,000
Total	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000

establecieron las clases y cantidad de genotipos homocigotos, heterocigotos, determinando luego, las frecuencias genotípicas y génicas, número de loci polimórficos, número de loci monomórficos, polimorfismo y Heterocigosidad media por loci para cada población (Perfectti y Pascual 2005).

Resultados

En las seis poblaciones de *A. cherimola* se encontró que la fosfoglucoasa isomerasa (GPI) presenta dos loci, siendo el locus Pgi-2 monomórfico y el locus Pgi-1 dimérico, con siete alelos y polimórfico, que permite diferenciar a las poblaciones entre sí (Fig. 1).

La población de La Cuesta, presentó un total de 8 genotipos diferentes para la enzima GPI, de los cuales el genotipo A₃A₅ presentó la mayor frecuencia 0,469 (Fig. 1A, Tabla 1); siete alelos de los cuales el más frecuente fue r(3) con 0,422 y una H_o

Tabla 2. Frecuencias génicas, Heterocigosidad observada y esperada para el locus Gpi-1 de la enzima fosfoglucoasa isomerasa en seis poblaciones de *Annona cherimola* de la Región La Libertad, junio 2006-diciembre 2007. Ho = Heterocigosidad observada, He = Heterocigosidad esperada, 2N = Número de genomas.

Población	Alelos							Total	Ho	He	2N
	p(1)	q(2)	r(3)	s(4)	t(5)	u(6)	z(7)				
La Cuesta	0,140	0,031	0,422	0,047	0,250	0,016	0,094	1,000	0,969	0,713	64
Paday	0,100	0,117	0,183	0,150	0,117	0,083	0,283	1,000	1,000	0,887	60
Samne	0,100	0,050	0,333	0,033	0,133	0,300	0,050	1,000	1,000	0,763	60
Cascas	0,016	0,113	0,323	0,113	0,097	0,226	0,113	1,000	1,000	0,799	62
Poroto	0,050	0,000	0,367	0,200	0,000	0,033	0,350	1,000	1,000	0,699	60
Trujillo	0,065	0,081	0,258	0,145	0,097	0,323	0,032	1,000	1,000	0,789	62

Tabla 3. Frecuencias génicas y genotípicas para los loci Pgi-2, Acph y Mdh de *Annona cherimola* en las poblaciones de La Cuesta, Paday, Samne, Cascas, Poroto y Trujillo de la Región La Libertad, junio 2006-diciembre 2007.

enzima	Locus	Alelos	Genotipo	Frecuencia alélica	Frecuencia genotípica
fosfoglucoasa isomerasa	Pgi-2	p (1)	P ₁ P ₁	1,000	1,000
fosfatasa ácida	Acph	p (1)	C ₁ C ₁	1,000	1,000
malato deshidrogenasa	Mdh	p (1)	D ₁ D ₁	1,000	1,000

elevada 0,969 (Tabla 2). En Paday se encontraron 11 genotipos de los cuales el A₃A₇ fue el más frecuente con 0,167 (Fig. 1B, Tabla 1), siete alelos de los cuales el más frecuente fue z(7) con 0,283 y una H_o de 1,000 (Tabla 2). Samne presentó un total de siete genotipos de los cuales el A₃A₆ fue el más frecuente con un valor de 0,333 (Fig. 1C, Tabla 1) y el alelo r(3) como el más frecuente con un valor de 0,333 y una H_o = 1 (Tabla 2). Cascas presentó un total de diez genotipos de los cuales el A₃A₆ fue el más frecuente con un valor de 0,323 (Fig. 1D, Tabla 1), y el alelo r(3) como el más frecuente con un valor de 0,323 y una H_o = 1 (Tabla 2). Poroto presentó un total de siete genotipos de los cuales el A₃A₇ fue el más frecuente con un valor de 0,467 (Fig. 1E, Tabla 1), y el alelo r(3) como el más frecuente con un valor de 0,367, no encontrándose los alelos q(2) y t(5) y una H_o igual a uno (Tabla 2). Trujillo presentó un total de diez genotipos de los cuales el A₃A₆ fue el más frecuente con un valor de 0,290 (Fig. 1F, Tabla 1), y el alelo u(6) como el más frecuente con un valor de 0,323 y una H_o igual a uno (Tabla 2).

Con respecto a los genotipos para el gen Pgi-1 presentes en las seis poblaciones de *A. cherimola* se encontró un total de veinte, de los cuales catorce fueron comunes entre las poblaciones y seis fueron únicos los que estuvieron distribuidos en las poblaciones de La Cuesta, Paday, Samne y Poroto (Tabla 1).

Las fosfatasa ácida y malato deshidrogenasa presentaron una sola banda en todos los individuos de las poblaciones estudiadas catalogándose como monomórficas (Tabla 3).

La enzima málica (monomérica) mostró una y dos bandas en los geles de corrido electroforético, encontrándose individuos homocigotos y heterocigotos con dos alelos en todas las poblaciones estudiadas. El genotipo de mayor frecuencia en la población de La Cuesta fue el B₁B₁ con valor de 0,531 (Tabla 4)

Tabla 4. Frecuencias genotípicas para el locus **Me** de la enzima málica en seis poblaciones de *Annona cherimola* de la Región La Libertad, junio 2006-diciembre 2007.

Población	Genotipo			Total
	B ₁ B ₁	B ₁ B ₂	B ₂ B ₂	
La Cuesta	0,531	0,125	0,344	1,000
Paday	0,667	0,200	0,133	1,000
Samne	0,065	0,194	0,742	1,000
Cascas	0,419	0,161	0,419	1,000
Poroto	0,461	0,385	0,154	1,000
Trujillo	0,400	0,367	0,233	1,000

y el alelo más frecuente fue p(1) con un valor de 0,594 y una H_o de 0,125 (Tabla 5). La población de Paday presentó al genotipo B₁B₁ y al alelo p(1) como los más frecuente con valores de 0,667 y 0,767 respectivamente (Tabla 4 y 5). B₂B₂ fue el genotipo más frecuente (0,742) y q(2) el alelo más frecuente (0,839) en la población de Samne (Tabla 4 y 5). Cascas presentó a los genotipos B₁B₁ y B₂B₂ en la misma proporción teniendo una frecuencia genotípica de 0,419 para ambos, siendo éstos más altos respecto al genotipo heterocigoto (Tabla 4); y consecuentemente una igual proporción alélica para los alelos p(1) y q(2) con un valor de 0,5 (Tabla 5). Poroto presentó al genotipo B₁B₁ como el más frecuente con un valor de 0,461 (Tabla 4) y al alelo p(1) como el de mayor valor (0,654) (Tabla 5).

Con respecto a la Heterocigosidad media de los loci polimórficos estudiados (Pgi-2, Me) se obtuvieron valores superiores a 0,200 en cada población, así como un valor de 0,400 en polimorfismo (Tabla 6).

Discusión

En el análisis de los cuatro sistemas isoenzimáticos (fosfoglucoasa isomerasa, fosfatasa ácida, malato deshidrogenasa y enzima málica) de las seis poblaciones en estudio se muestran dos loci en la fosfoglucoasa isomerasa (GPI). El locus Gpi-1 es polimórfico presentando siete alelos, enzima con velocidad de migración más lenta; el otro locus Pgi-2 es monomórfico cuya enzima presentó mayor velocidad de migración. Estos resultados concuerdan con los reportados por Perfectti (1995) quien en relación al monomorfismo isoenzimático para el gen Pgi-2 sostiene que este fenómeno es similar en *Cucumis sativus* y en la mayoría de las plantas (Gottlieb 1981) donde uno de los genes Pgi suele ser invariable y migrar más rápidamente que el de la fracción citosólica (Perfectti 1995). Esta zona invariable se asocia con el cloroplasto, aunque el gen que lo codifica sea nuclear. Gottlieb (1981) explica la falta de variabilidad de la enzima cloroplastidial

Tabla 5. Frecuencias génicas para el locus **Me** de la enzima málica en seis poblaciones de *Annona cherimola* de la Región La Libertad, Junio 2006-Diciembre 2007. Ho= Heterocigosidad observada; He= Heterocigosidad esperada; 2N= Número de genomas.

Población	Alelos		Total	Ho	He	2N
	p(1)	q(2)				
La Cuesta	0,594	0,406	1,000	0,125	0,482	64
Paday	0,767	0,233	1,000	0,200	0,357	60
Samne	0,161	0,839	1,000	0,194	0,270	62
Cascas	0,500	0,500	1,000	0,161	0,500	62
Poroto	0,654	0,346	1,000	0,385	0,452	52
Trujillo	0,583	0,417	1,000	0,367	0,486	60

basándose en los requerimientos conformacionales de la enzima, que debe realizar su función en el particular ambiente del cloroplasto y que debe migrar desde el citoplasma al organelo. Por tanto, todas las enzimas con funciones plastidiales tendrían la misma característica y su probable uniformidad en el reino vegetal.

Para el locus Gpi-1 se encuentran 20 de los 28 genotipos posibles por las combinaciones de los siete alelos en las seis poblaciones de *A. cherimola* (Fig. 1), significando esto un total de 71,43%. Estos resultados son elevados si se comparan con los tres genotipos reportados por Pascual et al. (1993) en siete cultivares españoles de chirimoyas y 10 genotipos reportados por Perfectti y Pascual (1998) quienes evaluaron 202 cultivares en América (122 del Perú, 39 de Ecuador, 10 de California, 10 de Chile y 3 de Bolivia) y en Europa (10 de Portugal y 8 de España). La diversidad genotípica presente en las poblaciones analizadas de La Libertad tendría su explicación al considerarse el norte del Perú como posible centro de origen (Morales et al. 2004) por lo que debe ser considerada como un reservorio genético para la especie.

De los 20 genotipos para el locus Pgi-1 se encuentran algunos que pueden considerarse como únicos para ciertas localidades; de ellos, dos genotipos se encuentran en La Cuesta, otros dos en Samne, uno en Paday y otro en Poroto y ninguno para Trujillo y Cascas (Fig. 1, Tabla 1). Situación semejante fue reportada para dos cultivares españoles, los que presentaron los genotipos A₂A₅ y A₂A₆, respectivamente y que han sido reportados por Pascual et al. (1993).

Genotipos comunes se encuentran en las seis poblaciones presentándose A₃A₄, A₃A₅ y A₃A₇ en cinco de las seis poblaciones (Tabla 1); resultados similares a lo reportado por Pascual et al. (1993) quienes encontraron común al genotipo A₄A₄ para

Tabla 6. Estimadores genéticos generales de seis poblaciones de *Annona cherimola* de la Región La Libertad, junio 2006-diciembre 2007.

Población	Estimador genético					
	Número de loci (NL)	Número de loci polimórficos (P)	Número de loci monomórficos (M)	Suma de las Heterocigosidad locus-específica (Ho)	Polimorfismo	Heterocigosidad media por locus
La Cuesta	5	2	3	1,094	0,400	0,219
Paday	5	2	3	1,200	0,400	0,240
Samne	5	2	3	1,194	0,400	0,239
Cascas	5	2	3	1,161	0,400	0,232
Poroto	5	2	3	1,385	0,400	0,277
Trujillo	5	2	3	1,367	0,400	0,273

cinco cultivares españoles (Campa, Campa Mejorada, Fino de Jete, Negrito y Pinchudo), y a los reportes de Perfectti y Pascual (1998) quienes también encontraron algunos genotipos comunes para los cultivares españoles, chilenos, bolivianos, peruanos, ecuatorianos y portugueses.

La diversidad génica diferencial que a su vez evidencia la cantidad y frecuencia de clases de genotipos, se debería al efecto combinado de la recombinación homóloga, casos de ligamiento génico, fecundación cruzada obligada y deriva génica, que originan plantones nuevos como producto de la germinación de las semillas de frutos de las propias plantas, así como, las que los agricultores ocasionalmente adquieren de diferente procedencia a los cultivos ancestrales, ya que el cultivo es tradicional, no existiendo planificación para su formación, reemplazo, abonamiento, control de plaga; es decir que se trata de cultivos naturales.

Los genotipos únicos encontrados en ciertas localidades, así como la ausencia de otros posibles genotipos tendrían su explicación en que el cultivo de *A. cherimola* está perdiendo algunos alelos por erosión genética asociado a deriva génica, ocasionado por expansión urbana, reemplazo por otros cultivos comerciales, conllevando a la disminución de su variabilidad y plasticidad genotípica.

Las diferencias de frecuencias génicas y de genotipos encontrados (tabla 1) tendrían su explicación en los efectos combinados de los agentes del párrafo anterior y su relación con el ambiente en el cual se encuentra cada plantación.

Cabe señalar que de los 20 genotipos que se observan no todos ellos son comunes para las seis poblaciones (Tabla 1), y que sólo en la población de La Cuesta se encuentra un ejemplar homocigoto (A_1A_1). Estos resultados demuestran que los ejemplares con genotipo heterocigoto prevalecen dada la fecundación cruzada obligada que existe.

En relación a los alelos, se observa que el alelo Pgi-1:3 presenta la mayor frecuencia en las poblaciones de La Cuesta (0,422), Samne (0,333), Cascas (0,323) y Poroto (0,367) y la menor frecuencia el alelo Pgi-1:6 en La Cuesta (0,016), Paday (0,083) y Poroto (0,033) (Tabla 2). Resultados que contrastan con lo obtenido por Perfectti y Pascual (2005) quienes obtuvieron una elevada frecuencia del alelo Pgi-1:6 (0,447) y no reportan al alelo Pgi-1:3 en la caracterización de *A. cherimola* de diferentes países entre los que figuran algunos cultivares peruanos, lo cual estaría posiblemente relacionado al origen de las poblaciones estudiadas.

La inexistencia de una planificación de los cultivares de *A. cherimola*, ya que se mantienen de manera natural, hace que las diferentes poblaciones que se han considerado en el presente estudio, no tengan el mismo tamaño; por eso, la ausencia de los alelos Pgi-1: 2 y Pgi-1:5 (Tabla 2) en la población de Poroto, podría atribuirse al efecto de la deriva génica por lo que no representaría exactamente las constituciones génicas de la población ancestral, ya que es el área geográfica rural en que se han talado más árboles para la expansión urbana, así como para reemplazo por otros cultivos.

La ausencia de ocho genotipos para el locus Pgi-1 probablemente se debería al tamaño muestral aplicado para cada población en función a la abundancia de individuos; también

se debería a una segregación anómala de los genes de este locus en *A. cherimola*, sugerido por Perfectti y Pascual (1996) quienes afirman que este fenómeno se explica por dos niveles de selección: selección gamética y selección cigótica que actúan evitando el desarrollo de algunos gametos que disminuyen la competencia por el polen (Jordán y Botti 1992) y la presencia de genes letales ligados a este desarrollo, que impiden que ciertos genotipos aparezcan en una población. A ello se agregaría, el efecto estocástico ocasionado por la disminución del tamaño de los cultivares por crecimiento de la población urbana y reemplazo por otros cultivares.

El monomorfismo que se observó en el perfil isoenzimático de la enzima fosfatasa ácida (APCH) en todas las poblaciones estudiadas (Tabla 3) impide la determinación de la estructura de la enzima. Este resultado apoya la tesis de Perfectti (1995) quien encontró similares resultados al estudiar ocho cultivares de *A. cherimola* procedentes de Perú (Perú 78, Perú seed 24), Chile (Serena), Estados Unidos (Chaffey Riverside, Bonita, White), España (Pinchudo, Manteca).

El monomorfismo que se observa en la enzima malato deshidrogenasa (MDH) en todas las poblaciones de *A. cherimola* estudiadas (Tabla 3) coinciden con lo reportado por Pascual et al. (1993) quienes determinaron que seis de siete cultivares españoles son monomórficos; sin embargo, contrastan con los obtenidos por Perfectti (1995) quien reportó dos loci (Mdh-1 y Mdh-2), siendo el gen Mdh-1 polimórfico con tres alelos y el gen Mdh-2 monomórfico de corrido más rápido, al estudiar ocho cultivares de *A. cherimola* en el Perú (Perú 78, Perú seed 24), Chile (Serena), Estados Unidos (Chaffey Riverside, Bonita, White) y , España (Pinchudo, Manteca). Dichos resultados difieren a los encontrados en la presente investigación probablemente debido al origen de la población estudiada.

Los perfiles isoenzimáticos que se observaron para la enzima málica (ME) en las seis poblaciones de *A. cherimola* muestran que existe un solo locus polimórfico con dos alelos donde se encuentran los tres genotipos, de una o de dos bandas (Tabla 4). Este hecho coincide con lo reportado por Perfectti (1995) al estudiar ocho cultivares españoles y contrasta con Pascual et al. (1993) quienes describieron a este sistema isoenzimático con un único gen monomórfico en siete cultivares españoles.

Con respecto a las diferentes frecuencias de los genotipos para el locus Me en las seis poblaciones de *A. cherimola* (Tabla 4) se encuentra que de los tres genotipos B_1B_1 , B_1B_2 y B_2B_2 predomina el B_1B_1 , que se presenta con la mayor frecuencia en cinco de las seis poblaciones estudiadas.

En relación a las frecuencias génicas del locus Me se observa la mayor frecuencia del alelo 1 en cinco poblaciones de *A. cherimola* a excepción de Samne (Tabla 5), resultado que es similar a los reportes de Perfectti y Pascual (2005) quienes encontraron una frecuencia de 0,645 para el alelo 1(p) al analizar 206 cultivares de este frutal de los países de mayor producción mundial (122 de Perú, 39 de Ecuador, 10 de EE.UU., 10 de Chile, 10 de Portugal, 8 de España, 3 de Bolivia y 4 cultivares adicionales de diversos lugares). Las similitudes observadas tendrían su explicación en la procedencia de los plantones que han dado origen a los cultivares foráneos, y la mayor frecuencia de este gen respecto a su alelo 2 tendría la explicación en la constitución genética propia de la especie y al común origen de ellos considerando que la zona

norte del Perú y sur de Ecuador constituyen el centro de origen de esta especie.

Los valores de heterocigosidad media por locus (Tabla 6) presentan una frecuencia mayor a 0,200, resultados que son superiores a los reportados por Perfectti y Pascual (2005) para cultivares de Bolivia (0,155), Chile (0,173), Ecuador (0,163), Portugal (0,139), España (0,150), Perú (0,188) y Estados Unidos (0,225). Su explicación reside también en el centro de origen de la especie.

En relación al polimorfismo, se muestra que todas las poblaciones presentan un valor de 0,400 estudiando cinco loci (Tabla 6), resultado que es superior al reportado para cultivares de Bolivia (0,318) pero inferior a los reportados para cultivares de Perú y Estados Unidos (0,591) (Perfectti y Pascual 2005) de 22 loci estudiados. Asimismo, este valor se aproxima al promedio reportado para plantas cultivadas (0,49) obtenido por Doebley (1990) pero es más bajo que el polimorfismo para este mismo tipo de plantas (0,612) reportado por Hamrick y Godt (1997) y es aún más bajo que el polimorfismo de *Annona squamosa* (0,869) reportado por Flores (2000). El polimorfismo está sujeto a un gran error muestral cuando pocos individuos o pocos loci son muestreados a pesar de ello es ampliamente usado como una medida de diversidad genética (Gottlieb 1981).

Los marcadores isoenzimáticos son adecuados para realizar monitoreos de la plasticidad del germoplasma debido a la relación directa del gen y su producto enzimático, lo que puede ser utilizados en programas de recuperación de alelos perdidos o disminuidos por erosión genética; por tanto el presente estudio aporta información suficiente para establecer el estado del germoplasma en La Libertad y la elaboración de programas de mejoramiento genético de interés en la agroexportación.

La variabilidad encontrada en los caracteres analizados de *A. cherimola* en las zonas estudiadas evidencia que la Región La Libertad cuenta con un rico acervo genético propio de las zonas de origen, que debería ser conservado y preservado mediante el desarrollo de programas adecuados de administración del recurso que lo salvaguarden de la expansión urbana y de monocultivos de agroexportación en esta Región; además de ser considerado como un reservorio genético importante del germoplasma de la especie de utilidad estratégica para programas de mejoramiento y transformarlo en un cultivo económicamente rentable y sostenible en nuestro país.

Agradecimiento

Nuestro sincero agradecimiento al Consejo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnológica (CONCYTEC) por apoyar en el Financiamiento de la presente investigación.

Literatura citada

- Bobadilla M., G.Zavaleta, F. Gil, et al. 2002. Efecto bioinsecticida del extracto etanólico de las semillas de *Annona cherimolia* miller "chirimoya" y *A. muricata* linneaus "guanabana" sobre larvas del IV estadio de *Anophles* sp. *Rev. peru. biol.* 9 (2):64-73
- Bonavia, D., Ochoa, C. M., Tovar S, O. AND Cerron P., R. 2004. Archaeological evidence of cherimoya (*Annona cherimolia* mill.) and guanabana (*Annona muricata* l.) in ancient Peru. *Economic Botany* 58(4) pp. 509-522. Available at: [http://dx.doi.org/10.1663/0013-0001\(2004\)058\[0509:AEOCAC\]2.0.CO;2](http://dx.doi.org/10.1663/0013-0001(2004)058[0509:AEOCAC]2.0.CO;2) [Accedido Noviembre 21, 2009].
- Bridg, H. 2000. Micropropagation and Determination of the in vitro Stability of *Annona cherimolia* Mill. and *Annona muricata* L. Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum agriculturalarum. eingereicht an der Landwirtschaftlich-Gärtnerischen Fakultät der Humboldt-Universität zu Berlin. Available at: <http://edoc.hu-berlin.de/dissertationen/bridg-hannia-2000-03-24/PDF/Bridg.pdf> (accedido Diciembre 3, 2009)
- Cautín, R. & Agustí, M. 2005. Phenological growth stages of the cherimoya tree (*Annona cherimolia* Mill.). *Scientia Horticulturae*, 105(4), 491-497. Available at: http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6TC3-4FRKVMV-1&_user=10&_rdoc=1&_fmt=&_orig=search&_sort=d&_docanchor=&view=c&_searchStrId=1103739811&_rerunOrigin=scholar.google&_acct=C000050221&_version=1&_urlVersion=0&_urlserid=10&md5=7fc24a57ddd2147e67877e270aeb3611 [Accedido October 23, 2009].
- Chen C.Y., F.R. Chang, W.B. Pan & Y.C. Wu. 2001. Four alkaloids from *Annona cherimolia*. *Phytochemistry*. 56(7):753 - 757.
- Chen C.Y., F.R. Chang, H.F. Chiu, et al. 1999. Aromin-A, an Annonaceous acetogenin from *Annona cherimolia*. *Phytochemistry*. 51(3):429-433.
- Chung-Yi Ch., Chang FR, Pan WB y Wu YCh. 2001. Four alkaloids from *Annona cherimolia*. *Phytochemistry*. 56:753-757.
- Doebley J.F. 1990. Isozyme evidence and the evolution of crop plants. In: Soltis D.E. and Soltis P.S. (ed), *Isozymes in Plant Biology*, Chapman and Hall, London, 165-191.
- Degli Esposti M., A. Ghelli, M. Ratta, et al. 1994. Natural substances (acetogenins) from the family Annonaceae are powerful inhibitors of mitochondrial NADH dehydrogenase (Complex I). *Biochem. J.* 301:161 - 167.
- Escribano, P., Viruel, M. A. and Hormaza, J. I. 2004. Characterization and cross-species amplification of microsatellite markers in cherimoya (*Annona cherimolia* Mill., Annonaceae). *Molecular Ecology Notes*, 4(4), 746-748. Available at: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1471-8286.2004.00809.x> [Accedido Noviembre 11, 2009].
- Flores G.J.S. 2000. Diversidad de *Annona squamosa* L en huertos familiares mayas de la Península de Yucatán. Universidad Autónoma de Yucatán, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Departamento de Botánica.
- Gottlieb L.D. 1981. Electrophoretic evidence and plant populations. *Prog. Phytochem.* 7:1-46.
- Hamrick J.L & M.J. Godt. 1997. Allozyme diversity in cultivated crops. *Crop Sci.* 37:26-30.
- Jordán, M. & C. Botti. 1992. Tropical and subtropical small fruits. In: Hammerschlag, F. & Litz, R. (eds.) *Biotechnology of perennial fruit crops. Biotechnology of Agriculture Series No. 8*, CAB International, Wallingford, U.K. pp. 513-531.
- Kim D.H., E.S. Ma, K.D. Suk, et al. 2001. Annonomolin and annoncherimolin, new cytotoxic annonaceous acetogenins from *Annona cherimolia* seeds. *Journal Natural products* 64(4):502-506.
- León B y Monsalve C. 2006. Annonaceae endémicas del Perú *Rev. peru. biol.* 13(2 (Número especial)): 35s - 41s. Available at: <http://sisbib.unmsm.edu.pe/BVRevistas/biologia/v13n2/pdf/a09.pdf>. (accedido at: Diciembre 3, 2009)
- Londershausen W., F. Leicht, F. Lieb, et al. 1991. Molecular mode of action of annonacins. *Pestic. Sci.* 33:427-438
- Martín P., F. J. Soria, M. Villagrán, et al. 2000. Evaluación de la capacidad inhibidora de la alimentación de un triturado de semillas de chirimoya, *Annona cherimolia* Miller (Annonaceae), sobre *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae). *Bol. San. Veg. Plagas* 26:297-303

- MINAG (Ministerio de Agricultura del Perú). 2006. Estadística agraria mensual: mes de julio. Dirección General de Información Agraria Ministerio de Agricultura. Lima, Perú. (<http://www.portalagrario.gob.pe/boletines/estadistica-agraria-mensual/4.html>)
- Morales A.R., B. Cueva & P.S. Aquino. 2004. Genetic diversity and geographic distribution of *Annona cherimola* in Southern Ecuador. *Journal of ecology and application Lyonia* 7(2):159-170.
- Morales A., A. R.; Medina M., A.; Criollo M., L.; Castro Q., P. 2006. Resultados interpretativos en la herencia de algunos caracteres de calidad en la Chirimoya (*Annona cherimola* Mill). *Lyonia*, 10(1), 1-16. Available at: <http://www.lyonia.org/downloadPDF.php?pdfID=2.459.1>. (accedido Diciembre 3, 2009).
- Pascual L.; F. Perfectti; M. Gutierrez & A.M. Vargas. 1993. Characterizing isozymes of spanish cherimoya cultivars. *Hort Science* 28(8):845-847.
- Perfectti F. & L. Pascual. 2005. Genetic diversity in a worldwide collection of cherimoya cultivars. *Genetic Resources and Crop Evolution* 52:959-966
- Perfectti F. & L. Pascual. 1998. Characterization of cherimoya germoplasm by isozyme markers. *Fruit varieties Journal* 52(1):53-62.
- Perfectti F. & L. Pascual. 1996. Segregation distortion of isozyme loci in cherimoya (*Annona cherimola* Mill.) *Theor Appl Genet*; 93: 440-446.
- Perfectti F. 1995. Estudio de marcadores genéticos en chirimoya y su aplicación a la identificación varietal. Evaluación de los recursos genéticos. PhD thesis. Universidad de Granada (España).
- Pinto, A.C. Q., Cordiero, M.C.R., de Andrade, S.R.M., Ferriera, F.R., de C. Filguieras, H.A., Alves, R.E. and Kinpara, D.I. (2005) *Annona* species, Southampton, UK, University of Southampton, International Centre for Underutilised Crops, 284pp. Available at: <http://www.icuc-iwmi.org/files...202005.pdf> (accedido Diciembre 3, 2009)
- Quispe A., J. Rojas, D. Zavala, et al. 2007. Efecto citotóxico de *Annona cherimola* (chirimoya) en cultivos celulares H-460 (carcinoma pulmonar de células grandes). *An Fac Med Lima (Universidad Nacional Mayor San Marcos.68 Suppl 1*.
- Samuel R., Pinsker, W., Balasubramaniam, S., and Morawetz, W. Allozyme diversity and systematics in Annonaceae - a pilot Project. 1991. P1. *Syst. Evol.* 178:125-134. Available at: <http://dx.doi.org/10.1007/BF00937960> [Accedido Noviembre 12, 2009].
- Vanhove, W. & Van Damme, P., 2008. Marketing of Chirimoya in the Andes for the Benefit of the Rural Poor and as a Tool for Agrobiodiversity Conservation En International Symposium on Underutilized Plants for Food Security, Nutrition, Income and Sustainable Development 806. *ISHS*, págs. 497-504.
- Wele A., Y. Zhang, J.P Brouard, et al. 2005. Two cyclopeptides from the seeds of *Annona cherimola*. *Phytochemistry* 66(19):2376-2380.
- Wele A., Y. Zhang, I. Ndoye, et al. 2004. A cytotoxic cyclic heptapeptide from the seeds of *Annona cherimola*. *Journal Natural Products* 67(9):1577-1579.
- Woo M.H., D.H. Kim, S.S. Fotopoulos & J.L. McLaughlin. 2000. Annocherin and (2,4)-cis- and trans-annocherionones, monotetrahydrofuran Annonaceous acetogenins with a C-7 carbonyl group from *Annona cherimolia* seeds. *Journal natural Products*. 63(2):294.
- Woo M.H., S.O. Chung & D.H. Kim. 1999. cis- Annonacin and (2,4)-cis-and trans-Isoannonacins: Cytotoxic Monotetrahydrofuran Annonaceous Acetogenins from the seeds of *Annona cherimolia*. *Archive Pharmaceutical Research* 22(5):524-528.
- Xu Z.F., X.Y. Wei, H.H. Xie & R.Z. Yang. 2002. Inhibition of oxygen consumption by annonaceous acetogenins in liver cell respiration and their structure-activity relationship. *Yao Xue Xue Bao* 37(10):818-20

