

Artículo Original

## Diversidad genética y filogenia molecular de poblaciones de *Mauritia flexuosa* L.f. "aguaje" de la Amazonía Peruana

[Genetic diversity and molecular phylogenie in populations of *Mauritia flexuosa* L.f. "aguaje" in the Peruvian Amazon]

Jorge Angulo-Quintanilla<sup>1</sup>, Jorge L. Marapara-Del Águila<sup>1</sup>, Dixner Rengifo-Trigoso<sup>1</sup>, Pedro M. Adrianzén-Julca<sup>1</sup>, Freddy Ramírez-Arévalo<sup>2</sup>, Janeth Braga-Vela<sup>1</sup>, Juan C. Castro-Gómez<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Investigación de La Facultad de Ciencias Biológicas. Departamento Académico de Ciencias Biomédicas y Biotecnología. Universidad Nacional de La Amazonía Peruana (UNAP). Pevas 5ta. Cuadra S/N. Iquitos-Perú.

<sup>2</sup> Departamento Académico de Manejo Forestal. Facultad de Ciencias Forestales. UNAP.

\*e-mail: juanccgomez@yahoo.es

### Resumen

*Mauritia flexuosa* es una especie vegetal amazónica que forma extensas poblaciones denominadas "aguajales". Como los pobladores amazónicos emplean varios órganos de *M. flexuosa* para suplir sus necesidades y con fines comerciales, se está ejerciendo un gran impacto negativo sobre esta especie. A pesar de ello, a la fecha no se conoce la diversidad genética de esta especie en la Amazonía peruana. Consecuentemente, los planes de manejo para la especie serían limitados sin este tipo de información. Por tanto, el objetivo de esta investigación fue determinar la diversidad genética y filogenia molecular de poblaciones de *M. flexuosa* aledañas a la carretera Iquitos-Nauta. Las hojas se colectaron en seis zonas contiguas a la carretera Iquitos-Nauta. El ADN purificado con protocolos estándares fue amplificado mediante la técnica de ADN Polimórfico Amplificado al Azar (RAPD) con dos cebadores aleatorios. En total se generaron 28 amplicones RAPD (26 polimórficos y 2 monomórficos). Dentro de los aguajales la diversidad genética fue tres veces mayor ( $75 \pm 19\%$ ) que la diversidad genética entre las seis poblaciones de *M. flexuosa* ( $25 \pm 19\%$ ). La diferenciación genética entre las poblaciones varió de 0,0 a 0,6. Los aguajales que se agruparon en clados en el dendrograma por su mayor similitud genética tuvieron proximidad geográfica. La similitud genética entre las poblaciones de *M. flexuosa* depende de la distancia geográfica, de tal manera que las poblaciones con más similitud genética están más próximas entre sí que las que tienen menos similitud genética.

**Palabras Clave:** frutos amazónicos, genética de poblaciones, palmera amazónica, RAPD.

### Abstract

*Mauritia flexuosa* is an Amazonian plant species that forms extensive populations called "aguajales". As the Amazonian villagers employ several organs of *M. flexuosa* to meet their needs and for commercial purposes, a major negative impact on this species is being found. Despite this, the genetic diversity of this species in the Peruvian Amazon is unknown so far. Consequently, the management plans for the species would be limited without this information. Therefore, the objective of this research was to determine the genetic diversity and molecular phylogeny of *M. flexuosa* populations adjacent to the Iquitos-Nauta road. The leaves were collected in six areas adjacent to the Iquitos-Nauta road. The purified DNA with standard protocols was amplified using the Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) technique with two random primers. A total of 28 RAPD amplicons (26 polymorphic and 2 monomorphic) were generated. Intrapopulation genetic diversity of aguajales was three times higher ( $75 \pm 19\%$ ) than the interpopulation genetic diversity among the six populations of *M. flexuosa* ( $25 \pm 19\%$ ). Genetic differentiation among populations ranged from 0.0 to 0.6. Aguajales which were grouped into clades in the dendrogram for their greater genetic similarity had great geographical proximity. The genetic similarity among populations of *M. flexuosa* depends on the geographical distance, so that populations with high genetic similarity are closer together than those with low genetic similarity.

**Keywords:** Amazonian fruits, population genetics, amazonian palm tree, RAPD.

## INTRODUCCIÓN

*Mauritia flexuosa* L.f. "aguaje" es una especie vegetal amazónica de gran importancia para los pobladores amazónicos porque las diferentes partes de esta planta sirven para suplir diversas necesidades. Primero, los frutos son alimentos con alto contenido de vitamina A. Segundo, las hojas y estípites sirven para la construcción de viviendas. Tercero, las semillas y ramas son útiles para elaborar artesanías. Finalmente, debido a que sus frutos contienen diversos metabolitos secundarios han despertado el interés en la industria farmacológica (Khan et al. 1993).

Sin embargo, la tala indiscriminada de las plantas hembras del aguaje para la cosecha de los frutos está provocando graves daños a la especie y al ecosistema. Se estima que en diez años se ha talado aproximadamente 5974 Ha de aguajales aledaños a Iquitos (Rodríguez 2001). Uno de los efectos adversos de la pérdida de aguajales puede ser la erosión y disminución de la diversidad genética de la especie. Además, la deforestación de grandes coberturas boscosas de la Amazonia peruana, debido a la explotación forestal y agropecuaria, está provocando una pérdida significativa de la biodiversidad y causando desequilibrios considerables en el ecosistema.

Por tanto, con fines de conservación y cultivo es fundamental conocer la variación genética dentro y entre las poblaciones de *M. flexuosa*. La alta diversidad genética de una especie es benéfica para su propagación, conservación, domesticación y la identificación de locus específicos. Además, es de gran utilidad para la identificación de genes (chance de contar con variantes génicas) con potencial uso biotecnológico, como aquellas implicadas en la biosíntesis de vitamina A. Asimismo, con fines evolutivos es de crucial importancia que las especies tengan una alta diversidad, porque al existir varios genotipos de la especie las probabilidades de su supervivencia son mayores. Debido a que pueden existir variantes genéticas capaces de adaptarse a las nuevas condiciones adversas. También, para establecer programas de mejoramiento genético y aprovechamiento racional del aguaje es necesario conocer la diversidad genética de sus poblaciones naturales. Los estudios de diversidad genética de esta especie son escasos (Arriaga 2001). Según Ferreyra y Grattapaglia (1998) y Rakoczy-

Trojanowska y Bolibok (2004), las técnicas más empleadas para detectar polimorfismos genéticos son: ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD), Polimorfismo en longitud de fragmentos amplificados (AFLP) y secuencia entre repeticiones simples (ISSR). Las técnicas mencionadas nos permiten identificar los marcadores moleculares que proporcionan información sobre la diversidad y relaciones filogenéticas en las colecciones de germoplasmas y poblaciones naturales de las especies. Además, la información molecular de diversidad y distancia genética permite sentar las bases para el desarrollo de programas de mejoramiento genético de las plantas (Phillips et al. 1993, Newbury y Ford-Lloyd 1993). En consecuencia, debido a la carencia de estudios moleculares de *M. flexuosa*, el objetivo de esta investigación fue determinar la diversidad genética y filogenia molecular de poblaciones de *M. flexuosa* aledañas a la carretera Iquitos-Nauta. Se empleó la técnica RAPD por su bajo costo y permitirnos detectar polimorfismos en todo el genoma, por su alta sensibilidad y porque ha sido empleado en varios estudios de diversidad genética en diversas especies de plantas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Colecta y transporte de material botánico

Las muestras botánicas se recolectaron en seis aguajales aledaños a la carretera Iquitos-Nauta (entre los kilómetros 2,5 y 56). En cada zona se delimitó un área de 100 m<sup>2</sup>, donde se registró y marcó a todos los ejemplares de *M. flexuosa* con un DAP  $\geq$  40 cm. Los sitios de muestreo (Figura 1) pertenecieron a la zona 18M cuyos datos de georeferenciación son: zona 1 (688053 mE y 9578923 mS), zona 2 (686486 mE y 9576286 mS), zona 3 (681791 mE y 9667677 mS), zona 4 (661094 mE y 9529250 mS), zona 5 (668507 mE y 9532243 mS) y zona 6 (670553 mE y 9533097 mS). De cada zona seleccionada se obtuvo una muestra aleatoria representativa (en promedio 15%) del aguajal. El número de plantas colectadas fueron 14 (zona 1), 20 (zona 2), 10 (zona 3), 7 (zona 4), 6 (zona 5) y 5 (zona 6). Las muestras colectadas fueron transportadas en condiciones de refrigeración y protegidas de la luz para su procesamiento

en el Laboratorio del Instituto de Investigación de la Facultad de Ciencias

Biológicas.



**Figura 1.** Zona de colecta de las muestras botánicas de *M. Flexuosa*

### **Purificación del ADN genómico**

Se realizó según el método propuesto por Doyle y Doyle (1987). La calidad y cantidad del ADN se determinó por el método espectrofotométrico y electroforético según Sambrook et al. (1989). El ADN purificado fue almacenado en alícuotas de 20  $\mu$ L a  $-20^{\circ}\text{C}$ , hasta su uso en los ensayos de RAPD.

### **Amplificación del ADN genómico con cebadores aleatorios (RAPD)**

Se realizó de acuerdo a Innis et al. (1990). Para la reacción se empleó el Buffer PCR 1 X,  $\text{MgCl}_2$  2,0 mM, desoxirribonucleótidos 0,8 mM, cebadores aleatorios 01 (5'-AGTCCCCTAGAATAGTTACA-3') o 02 (5'-GACGGTATCTGATCGTCTT-3') 0,25  $\mu$ M, ADN polimerasa Taq 0,25 U/ $\mu$ L, ADN genómico 50 ng y agua ultrapura c.s.p 20  $\mu$ L. Las reacciones se realizaron en un termociclador Techne (FTGENE2D) en las siguientes condiciones:  $95^{\circ}\text{C}$  por 5 min, 40 ciclos de  $94^{\circ}\text{C}$  por 1 min,  $40^{\circ}\text{C}$  por 1 min,  $72^{\circ}\text{C}$  por 1 min, extensión final a  $72^{\circ}\text{C}$  por 5 min. Los productos obtenidos fueron resueltos en gel de agarosa al 2% (más bromuro de etidio 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) a 110 V por 3 h. Posteriormente, los geles expuestos a luz ultravioleta de un

transiluminador fueron fotografiados con el Sistema Kodak EDAS.

### **Análisis de datos**

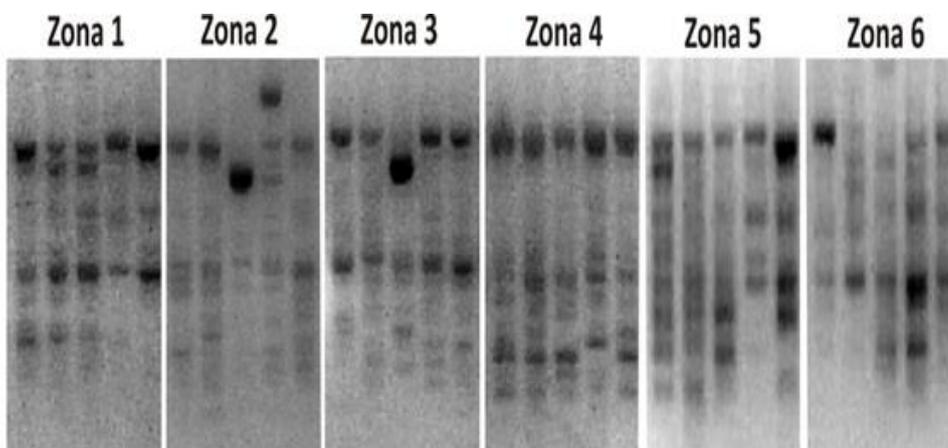
Las bandas de ADN (amplicones RAPD) se registraron con un sistema de codificación binario (1 = presencia de banda de ADN y 0 = ausencia de banda de ADN). Con los datos binarios se elaboró una matriz de distancia euclidiana, que se empleó para determinar la variancia molecular porcentual (AMOVA) dentro y entre los seis aguajales evaluados. Asimismo, se determinó la diferenciación genética entre las poblaciones de aguajales con el estadístico  $\Phi_{ST}$  (análogo a  $F_{ST}$  de Wright). Estos análisis se hicieron de acuerdo a Excoffier et al. (1992) con el programa ARLEQUIN v 3,01 desarrollado por Schneider et al. (2000). A partir de la matriz de similitud del coeficiente de concordancia simple obtenido de los datos binarios, se construyó el dendrograma, empleando el método de agrupamiento por medias aritméticas no ponderadas (UPGMA) con el programa NTSYS v 2,01, desarrollado por Rohlf (2001). Además, según Sneath y Sokal (1973), se estimó la correlación cofenética entre la matriz de similitud y los grupos formados en el

dendrograma, este cálculo también se realizó con el programa NTSYS v 2.01.

**RESULTADOS**

Los dos cebadores aleatorios empleados generaron amplicones RAPD monomórficos y polimórficos. De los 28 amplicones de tamaño variable, el 75 % fueron polimórficos (bandas

de ADN presentes o ausentes) y los demás (25 %) fueron monomórficos (bandas de ADN presentes en todas las muestras analizadas). Con el cebador 01 fue posible diferenciar los ejemplares de *M. flexuosa* dentro y entre las seis zonas de colecta por la variación en su patrón electroforético de amplicones (Figura 2).



**Figura2.** Ampliaciones polimórficos y monomórficos generados mediante el cebador 01 de cinco ejemplares de *M. Flexuosa* procedente de seis zonas de colecta

La diversidad genética dentro de las poblaciones fue mayor que la diversidad genética entre las poblaciones de aguaje. Dentro de los aguajales la diversidad genética fue tres veces mayor ( $75 \pm 19\%$ ) que la diversidad genética entre las seis poblaciones de aguaje ( $25 \pm 19\%$ ). Además, en las poblaciones de las zonas 5 y 6 toda la diversidad genética se atribuyó a la variación

dentro de las poblaciones. Porcentajes similarmente altos fueron observados en otras poblaciones (4 con 5 y 4 con 6). Algunas excepciones a las tendencias observadas fueron mostradas por los pares de aguajales 3 con 4, 3 con 5 y 3 con 6, caracterizados porque más del 50 % de su diversidad genética se debió a la variación entre sus poblaciones (Tabla 1).

**Tabla1.** Variación molecular porcentual de *M. Flexuosa* entre (diagonal superior derecha y dentro (diagonal inferior izquierda) de las poblaciones evaluadas.

Zona de Colecta	1	2	3	4	5	6
1		10,3	19,1	15,1	18,3	18,7
2	89,7		22,8	29,1	32,2	31,9
3	81,0	77,2		53,3	58,4	53,6
4	84,9	70,9	46,7		0,5	7,4
5	81,7	67,8	41,6	99,5		0,0
6	81,3	68,1	46,4	92,6	100,0	

Los aguajales mostraron varios niveles de diferenciación genética ( $\Phi_{ST}$ ). Los valores de este parámetro estadístico entre las poblaciones evaluadas, desde el más bajo al más alto, fueron: 0,0 (zonas 4/5 y 5/6), 0,1 (zonas 1/2 y 4/6), 0,2 (zonas 1/3, 1/4, 1/5, 1/6 y 2/3), 0,3 (zonas 2/4, 2/5 y 2/6), 0,5 (zonas 3/4 y 3/6) y 0,6 (zonas 3/5).

La relación filogenética entre las muestras de los seis aguajales presentó varias características destacables (Figura 3). Primero, la correlación cofenética fue alta (aproximadamente 0,75) entre la matriz de similitud y los grupos formados en el dendrograma. Segundo, al 72% de la similitud genética estuvo expresada por la formación de tres grupos (G1, G2 y G3) que incluyeron al 97% de los ejemplares analizados. El G1 estuvo constituido predominantemente por individuos de las zonas 4 (86%), 5 (83%) y 6 (100%) y en menor proporción de individuos de las zonas 1 (36%) y 2 (5%). El G2 agrupó principalmente individuos de las zonas 2 (95%) y 3 (100%), y algunos individuos de las zonas 1 (36%), 4 (14%) y 5 (17%). Finalmente, el G3 estuvo conformado por el 28% de los individuos de la zona 1. La tercera característica del dendrograma fue la presencia de individuos genéticamente idénticos obtenidos de diferentes zonas (D6 con F1 de las zonas 4 y 5 respectivamente) o a la misma zona (C8 con C9 y C1 con C2 de la zona 3).

## DISCUSIÓN

Mediante la técnica RAPD hemos podido detectar polimorfismos en el genoma de *M. flexuosa*. Aproximadamente, las tres cuartas partes de las bandas de ADN amplificadas fueron polimórficas. Estudios similares realizados con otras especies de plantas también reportan altos porcentajes de polimorfismos con la técnica RAPD, como en *Trifolium pratense* con 65 a 93% (Ulloa et al. 2003), en *Trigonella spp.* con 70% (Dangi et al. 2004), en *Torreya jackii* con 66% (Li et al. 2007) y en *Guisotia spp.* con 85 a 99% (Geleta et al. 2007). Los polimorfismos detectados con el ensayo RAPD pueden deberse a delecciones e inserciones (indels) o sustituciones nucleotídicas (transiciones o transversiones) en las secuencias donde hibridan los cebadores aleatorios (Williams et al. 1990). Adicionalmente, los polimorfismos

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

La diversidad genética dentro de los aguajales fue tres veces más alta que la diversidad entre los aguajales, aunque hay algunas excepciones a la regla general (Tabla 1). Estudios realizados con otras especies de plantas también reportan predominancia de la diversidad genética dentro de las poblaciones. Para *Trifolium pratense* es 80,4% (Ulloa et al. 2003), en *Terminalia amazonia* es 94,4% (Pither et al. 2003), en poblaciones de *Lepidium draba* es 58,7% (Aksakal et al. 2010). En contraste a lo indicado, Li et al. (2007) registran mayor diversidad genética entre poblaciones (57,4%) que dentro de las poblaciones (42,6%) de *Torreya jackii*. Resultados similares hemos observado en algunos aguajales (Tabla 1).

Según Avise (2004), cuanto más alta es la diversidad genética intrapoblacional (heterocigosidad media) se incrementa la probabilidad de supervivencia de la población en el tiempo evolutivo y ecológico. De acuerdo con Hartl y Clark (1997), la diversidad genética de las poblaciones se debe a la acción simultáneamente de la mutación, la selección natural, la migración y la deriva genética. Estas fuerzas evolutivas afectan tanto la variación genética dentro de las poblaciones como la divergencia genética entre las poblaciones. La diversidad genética intrapoblacional puede aumentar debido a la mutación, migración y algunos tipos de selección y puede disminuir mediante la deriva genética y algunos tipos de selección natural. Es importante tener presente que las poblaciones son afectadas por varias fuerzas evolutivas al mismo tiempo y la evolución es resultado de la interacción compleja de numerosos procesos.

Las poblaciones de aguaje que forman parte de los grupos del dendrograma (Figura 3), están ubicadas geográficamente muy próximas entre sí. Por ejemplo, el G1 que está conformado por aguajales de las zonas 4, 5 y 6 están separados por menos de 10 km (Figura 1). En consecuencia, la alta similitud entre estas poblaciones se puede atribuir a un mayor flujo genético, que puede ser a través de la dispersión de semillas por aves y mamíferos que se alimentan de los frutos de

*M. flexuosa* o la dispersión del polen por el viento, las aves e insectos polinizadores. Cabe indicar que entre estos aguajales no existen barreras naturales que podrían limitar el flujo genético. En contraste, las poblaciones de *M. flexuosa* más alejadas muestran mayor distancia genética, lo cual podría deberse al menor flujo de genes entre ellas. De acuerdo a lo mencionado, Hartl y Clark (1997) manifiestan que la migración (flujo de genes) disminuye la diferenciación genética entre las poblaciones y por ende incrementa su similitud genética.

La investigación realizada tuvo varias limitaciones que debemos comentar. Por una parte está el pequeño tamaño de la muestra y el limitado número de poblaciones evaluadas. Además, la técnica RAPD es poco reproducible entre los laboratorios, por lo que las condiciones de amplificación establecidas en nuestro laboratorio no brindarían resultados similares en otros. Un problema importante también es el nivel de incertidumbre al asignar las bandas polimórficas y monomórficas, debido a la intensidad variable de las bandas de ADN entre las muestras, distorsiones en la migración de las bandas del ADN en el gel y la insuficiente resolución de las bandas de tamaños semejantes en el gel de agarosa, inconvenientes que se han superado en su mayoría cuando los geles fueron evaluados por tres personas y llegando a un consenso.

Es necesario realizar más investigaciones del aguaje para su aprovechamiento sostenible y darle valor agregado. Debemos realizar estudios similares en toda la amazonía con el RAPD y otras herramientas moleculares como ISSR, AFLP, microsatélites, ISSR entre otras a fin de evaluar la extensión de la diversidad genética de esta especie, e identificar poblaciones con mayor diversidad genética que deben ser conservadas y aprovechadas mediante estrategias de conservación in situ y ex situ. Otros estudios necesarios son la identificación de marcadores moleculares que nos permitan diferenciar plantas de ambos sexos, búsqueda de marcadores que estén asociados con la resistencia a factores bióticos y abióticos adversos, identificación de marcadores asociados con la calidad y tamaño del fruto, entre otros. Además, con las tecnologías disponibles podemos estudiar el

genoma, transcriptoma, proteoma y el metaboloma, investigaciones que en conjunto contribuirán a la implementación de programas de mejoramiento genético asistido por marcadores moleculares, mejora de la especie mediante intragénesis e implementación de procesos biotecnológicos a través de la ingeniería metabólica para aumentar el contenido de productos de interés alimenticio, farmacológico y agroindustrial, dando valor agregado a los productos derivados del aguaje.

## CONCLUSIONES

Mediante la técnica RAPD con los cebadores aleatorios empleados se puede detectar polimorfismos en el genoma de *M. flexuosa*, por tanto son apropiados para estudios de la diversidad genética de esta especie. Además, la diversidad genética dentro de las poblaciones es tres veces mayor que la diversidad genética entre las poblaciones estudiadas de *M. flexuosa*, aunque algunas poblaciones fueron excepcionales a este patrón común. Finalmente, la similitud genética entre las poblaciones de *M. flexuosa* depende de la distancia geográfica que hay entre ellas, de tal manera que las poblaciones con más similitud genética están contiguas y las que tienen menos similitud genética están más alejadas geográficamente.

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana (UNAP) por el financiamiento del Proyecto de Investigación "Diversidad Genética de Poblaciones de *Mauritia flexuosa* L.f. "Aguaje" en la carretera Iquitos-Nauta y río Itaya" y uno de los resultados de esta investigación es el presente artículo científico publicado. También agradecemos al personal del Parque Turístico de Quistococha y a los pobladores de las comunidades del río Itaya por su apoyo en la guía y colecta de las muestras.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arriaga G. 2001. El cultivo de aguaje. Programa Integral de Desarrollo y Conservación Pacaya Samiria WWF-AIF/DK. 1-13.
- Aksakal O, Sunar S, Kaya Y, Agar G. 2010. Genetic diversity within and among *Lepidium draba* populations from Eastern

- Anatolia based on RAPD analysis. *Biochem Genet* 48(7-8): 603-611.
- Avise J. 2004. Molecular markers, natural history and evolution. Second edition. Sinauer Associates, Inc. Publishers. Sunderland Massachusetts. 684p.
- Dangi RS, Lagu MD, Choudhary LB, Ranjekar PK, Gupta VS. 2004. Assessment of genetic diversity in *Trigonella foenum-graecum* and *Trigonella caerulea* using ISSR and RAPD markers. *BMC Plant Biol* 30(4): 13.
- Doyle J, Doyle J. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull* 19: 11-15.
- Excoffier L, Smouse PE, Quattro JM. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131: 479-491.
- Ferreira M, Grattapaglia D. 1998. Introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genética. 1 Edición. Brasilia: EMBRAPA-CENARGEN. 220p.
- Geleta M, Bryngelsson T, Bekele E, Dagne K. 2007. AFLP and RAPD analyses of genetic diversity of wild and/or weedy *Guizotia* (Asteraceae) from Ethiopia. *Hereditas* 144(2): 53-62.
- Hartl DL, Clark AG. 1997. Principles of Population Genetics. Third edition. Sinauer Associates, Inc. Publishers. Sunderland, Massachusetts. 542 p.
- Innis M, Gelfand D, Sninsky J. 1990. PCR Protocols, a guide to methods and applications. Academic Press. INC. San Diego-California.
- Khan F, Mejia K, Moussa F. 1993. *Mauritia flexuosa* (Palmae), la más acuática de las palmeras amazónicas. En Las plantas vasculares en las aguas continentales del Perú. Instituto Francés de Estudios Andinos (IFEA). Editores Khan, F.; León, B., y Young, K. p.287- 308
- Li JH, Jin ZX, Li JM. 2007. Genetic diversity of endangered plant *Torreya jackii*: a study with RAPD markers. *Ying Yong Sheng Tai Xue Bao*. 18(12): 2661-2667.
- Newbury HJ, Ford-Lloyd BV. 1993. The use of RAPD for assessing variation in plants. *Plant Growth Regul* 12: 43-51.
- Phillips TD, Murphy JP, Goodman MM. 1993. Isozyme variation in germplasm accessions of the wild oat *Avena sterilis* L. *Theor. Appl Genet*. 86: 54-64.
- Pither R, Shore JS, Kellman M. 2003. Genetic diversity of the tropical tree *Terminalia amazonia* (Combretaceae) in naturally fragmented populations. *Heredity*. 91(3): 307-313
- Rakoczy-Trojanowska M, Bolibok H. 2004. Characteristics and a comparison of three classes of microsatellite-based markers and their application in plants. *Cell Mol Biol Lett* 9(2): 221-238.
- Rodríguez V. 2001. Monitoreo de la deforestación y uso de la tierra en el área de influencia de la carretera Iquitos-Nauta. Tesis de Titulación de Ingeniero de Ciencias Forestales. Universidad Nacional de la Amazonía Peruana. Iquitos - Perú.
- Rohlf F. 2001. NTSYS-pc. Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, version 2.01. Exeter Software Setauket, New York.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schneider S, Roessli D, Excoffier L. 2000. Arlequin: A Software for Population Genetics Data Analysis, Versión 2.0. Laboratory of Genetics and Biometry, Department of Antropology. University of Ginebra, Suiza.
- Sneath PH, Sokal RR. 1973. Numerical Taxonomy. Freeman. San Francisco. 573p.
- Ulloa O, Ortega F, Campos H. 2003. Analysis of genetic diversity in red clover (*Trifolium pratense* L.) breeding populations as revealed by RAPD genetic markers. *Genome*. 46(4): 529-535.
- Williams JG, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA et al. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res* 18: 6531-6535.