

VARIABILIDAD GENÉTICA DE CINCO POBLACIONES NATURALES DE CAMU-CAMU (*Myrciaria dubia* H.B.K. Mc. Vaugh) DE LA AMAZONÍA PERUANA, EVALUADAS MEDIANTE DALP

Carmen GARCÍA-DÁVILA¹, Mike CORAZÓN-GUIVIN², Diana CASTRO¹, Werner CHOTA¹, Ángel RODRÍGUEZ², Cesar DELGADO-VÁSQUEZ³, Jean-François RENNO⁴

- 1 Instituto de Investigaciones de la Amazonia Peruana (IIAP), Laboratorio de Biología y Genética Molecular (LBGM), Av. Abelardo Quiñones km 2.5, Iquitos, Perú; e-mail: cdavila19@yahoo.com
- 2 Investigadores becados del Laboratorio de Biología y Genética Molecular del IIAP, Av. Abelardo Quiñones km 2.5, Iquitos, Perú.
- 3 Laboratorio de Entomología del IIAP, Av. Abelardo Quiñones km 2.5, Iquitos, Perú.
- 4 Institut de Recherche pour le Développement, Montpellier, Francia

RESUMEN

La variabilidad genética dentro y entre cinco poblaciones naturales (Napo, Tigre, Ucayali, Putumayo y Curaray) de camu-camu (*Myrciaria dubia* H.B.K. Mc. Vaugh) localizados en la Amazonía peruana fueron evaluadas mediante dos marcadores DALP (Amplificación Directa de Polimorfismo de Longitud). Los resultados muestran diferentes niveles de diversidad genética dentro de las poblaciones, siendo que la mayor diversidad fue encontrada en la población del Putumayo (16 genotipos) y la menor en el Curaray (4 genotipos), estos resultados podrían estar relacionados con el tamaño poblacional de las mismas y con la distancia geográfica entre ellas (dentro y entre las cuencas). A pesar que el análisis de AFC infiere la conformación de cuatro agrupaciones principales (a = Ucayali, b = Putumayo, c = Tigre y d = una agrupación mixta conformada por todos los individuos del Napo y Curaray, mas un individuo del Putumayo) entre las cinco poblaciones analizadas. Los resultados del índice de fijación (F_{st}) y distancia genética (promedios: $F_{st} = 0.661$ y Distancia genética = 1.129) muestran que estas se encuentran fuertemente estructuradas, siendo que las poblaciones más cercanamente relacionadas son Napo y Curaray ($F_{st} = 0.489$, distancia genética = 0.670), y las más distantes Tigre y Ucayali ($F_{st} = 0.805$, Distancia genética = 1.635), lo cual podría ser explicado por las grandes distancias geográficas que estaría limitando el flujo de genes entre ellas.

PALABRAS CLAVE: Variabilidad genética, DALP, *Myrciaria dubia*, Amazonía peruana.

GENETIC VARIABILITY IN FIVE NATURAL POPULATIONS OF CAMU-CAMU (*Myrciaria dubia* HBK Mc. Vaugh) OF THE PERUVIAN AMAZON, EVALUATED BY DALP

ABSTRACT

The genetic variability within and among five natural populations (Napo, Tigre, Ucayali, Putumayo and Curaray) of camu-camu (*Myrciaria dubia* HBK Mc. Vaugh) located in the Peruvian Amazon were evaluated through two markers DALP (Direct Amplification Length Polymorphism). The results show different levels of genetic diversity within populations, being the highest diversity found in the Putumayo population (16 genotypes) and the lowest in the Curaray (4 genotypes), these results could be related to their population sizes and geographical distance between them (within and between basins). Although the analysis of AFC suggests the formation of four main groups (a = Ucayali, b = Putumayo, c = Tigre, D = a mixed group made up of all individuals from Napo and Curaray, plus an individual of Putumayo) among the five analyzed populations. The results of the fixation index (F_{st}) and genetic distance (average $F_{st} = 0.661$ and genetic distance = 1.129) show that they are highly structured populations, being Napo and Curaray more closely related ($F_{st} = 0.489$, genetic distance = 0.670); and Ucayali and Tiger the most distant ($F_{st} = 0.805$, genetic distance = 1.635), which could be explained by the geographic distances that would be limiting the gene flow between these populations.

KEYWORDS: Genetic variability, DALP, *Myrciaria dubia*, Peruvian Amazon.

INTRODUCCIÓN

El camu-camu (*Myrciaria dubia* H.B.K. Mc. Vaughn) es un frutal amazónico de amplia distribución en la Amazonía peruana, colombiana, brasileña y venezolana (Alves *et al.*, 2002). Este frutal tiene un gran potencial económico debido a que sus frutos poseen un alto contenido de ácido ascórbico (877 a 3079 mg/100 g de pulpa), por lo que gozan de amplia aceptación en los mercados externos (Pinedo *et al.*, 2001; Rodríguez *et al.*, 2001; Silva, 2006; Rojas, 2008). Hasta el momento esta demanda es cubierta mayoritariamente por la colecta de frutos en rodales naturales, muchas veces sin un manejo adecuado, empleándose métodos prohibitivos (sobrecosecha, desgarramiento de ramas y árboles). Estos métodos ponen en riesgo las poblaciones naturales, los procesos ecológicos y evolutivos que en ellas se producen (Delgado & Couturier, 2004), por lo que el conocimiento de la variabilidad genética es un factor importante para el manejo y conservación de las especies.

Actualmente la variabilidad genética del camu camu en rodales naturales es poco conocido (Penn, 2006), siendo necesario evaluar su estado de conservación. En este sentido los marcadores moleculares, son herramientas fuertemente utilizadas para obtener estas informaciones. Esto debido al desarrollo de la tecnología del PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) que hizo posible la construcción de un número considerable de marcadores moleculares para la caracterización genética y el estudio de las relaciones a nivel inter e intrapoblacional (Hartl & Clark, 1997; Karp *et al.*, 1997; Ferreira & Grattapaglia, 1998). Los marcadores DALP (Amplificación Directa del Polimorfismo de Longitud), son poderosas herramientas moleculares cuando no se tiene un conocimiento previo del genoma de la especie en estudio, debido a que esta técnica combina las ventajas de una alta resolución, reproducibilidad y la posibilidad de estimar la variabilidad genética en especies animales y vegetales (Desmarais *et al.*, 1998; Hansen *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2003; Langar *et al.*, 2003; Ma *et al.*, 2008).

Es conocido que desde un punto de vista evolutivo, las poblaciones con baja variabilidad genética tienen un reducido potencial para adaptarse a los cambios del ambiente, imposibilitando de este modo su permanencia en el tiempo. Es decir, el nivel de diversidad genética es crítico para lograr que una especie se adapte a un cambio medio ambiental y evolucione (Frankham, *et al.*, 2008). Siendo necesario conocer los patrones de diversidad genética, la estructura poblacional, así como determinar los procesos genéticos involucrados en la creación de estos patrones; para poder tomar medidas de

conservación y definir estrategias de manejo sostenido adecuadas para una especie (Wahid *et al.*, 2010). Asimismo patrones de variaciones genéticas pueden también ser utilizados para establecer divisiones biogeográficas que pueden ser especialmente utilizados en el diseño de estrategias de conservación (Wahid *et al.*, 2010). En este sentido el presente estudio pretende contribuir al conocimiento de esta especie a través de la estimación de la variabilidad genética del camu-camu en cinco poblaciones naturales evaluado mediante marcadores DALP, generando datos que puedan ser utilizados como bases para futuros trabajos en mejoramiento genético de la especie.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIAL BIOLÓGICO Y AREA DE ESTUDIO

Se colectaron muestras biológicas (brotes de tejido foliar) de 100 individuos en cinco poblaciones naturales de camu-camu *Myrciaria dubia* en la Región Loreto (Fig. 1), localizadas en los ríos: Napo (lago Nuñez 03° 21.70' S/72° 49.81' W), Curaray (lago Capihuara 02° 14' S/74° 20' W), Tigre (lago Huami 03° 26' S/74° 47' W), Ucayali (lago Supay 4° 55' S/73° 40' W) y Putumayo (02° 22' 19.3" S/72° 47' 46.1" W). Las muestras fueron conservadas en tubos conteniendo piedras secantes (Sulfato de calcio anhidro) hasta el momento de la extracción.

ANÁLISIS DE LABORATORIO

La extracción de ADN se realizó a partir de 100 mg de tejido foliar mediante el protocolo CTAB de Doyle & Doyle (1987). La amplificación del ADN fue realizada mediante la técnica DALP (Desmarais *et al.*, 1998), obteniendo ocho marcadores a partir de las combinaciones de un cebador (primer) reverso con ocho cebadores selectivos (Tabla 1), produciendo un patrón específico de bandas múltiples para cada marcador. Las reacciones de amplificación fueron realizadas en volúmenes totales de 20 µl, conteniendo: 100 ng/µl de ADN molde, 5 U/µl de Taq polimerasa, 5X de Buffer, 10 mM dNTPs, 25 mM de MgCl₂, 10 µM de cada primer y agua ultrapura. Las condiciones de temperatura fueron: denaturación inicial a 95 °C x 1 min., seguida de 29 ciclos consistentes en: a) denaturación a 91 °C x 30 seg.; b) hibridación a 47.8 °C x 30 seg.; y c) extensión a 72 °C x 30 seg. Las amplificaciones fueron verificadas preliminarmente en geles de agarosa 2% teñidos con bromuro de etidio (10 mg/ml). Posteriormente se verificó el polimorfismo entre las muestras en geles de poliacrilamida al 6%, teñidos con nitrato de plata mediante el método Rabbat (Sambrook & Russell, 1991).

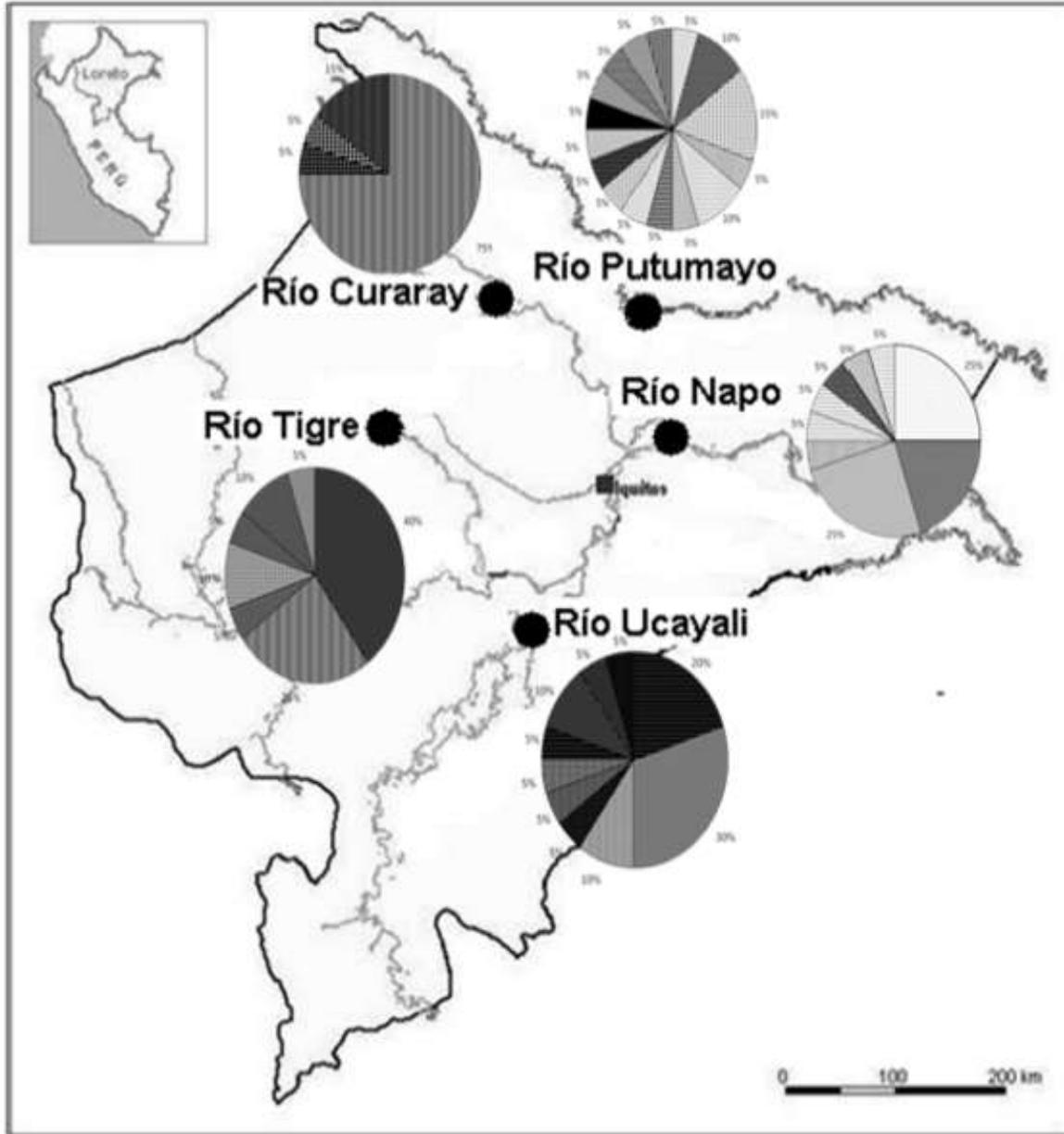


Figura 1. Genotipos encontrados mediante los marcadores DALP 03 y DALP 05 para cada población natural de camu camu *Myrciaria dubia* analizados en la región Loreto.

Tabla 1. Marcadores DALP (Desmarais *et al.*, 1998) utilizados en el análisis de las poblaciones de camu-camu *Myrciaria dubia* de la región Loreto.

TIPO DE PRIMERS	PRIMERS	SECUENCIA
Primer reverso	DALP R	TTTCACACAGGAAACAGCTATGAC
Primers selectivos	DALP 221	GTTTTCCCAGTCACGACGC
	DALP 231	GTTTTCCCAGTCACGACAGC
	DALP 232	GTTTTCCCAGTCACGACGAC
	DALP 233	GTTTTCCCAGTCACGACACG
	DALP 234	GTTTTCCCAGTCACGAC CAG
	DALP 235	GTTTTCCCAGTCACGAC CAC
	DALP 241	GTTTTCCCAGTCACGACTCAG
	DALP 242	GTTTTCCCAGTCACGAC CTAG

TRATAMIENTO DE DATOS

Para los análisis genéticos se realizó una matriz binaria en base a la observación de presencia (1) y ausencia (0) de las bandas polimórficas (diferenciales) entre los individuos. La variabilidad genética a nivel intra e interpoblacional fue evaluada mediante el Análisis Factorial de Correspondencia (AFC), la diferenciación entre las poblaciones fue estimada en base al estimador del índice de fijación (F_{st}) propuesto por Weir & Cockerham (1984). Estos análisis fueron realizados con la ayuda del software GENETIX versión 4.05 (Belkhir *et al.*, 2004). Las relaciones entre las poblaciones fue establecida en base a un dendrograma elaborado a partir de la distancia genética (D) obtenida mediante la fórmula $D = -\ln(1 - F_{st})$ propuesta por Reynolds *et al.* (1983) con la ayuda del software PHYLIP versión 3.5 (Felsenstein, 1993) y visualizado con el software TREEVIEW (Page, 1996).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

POLIMORFISMO DE LOS MARCADORES DALP EN CAMU-CAMU

De los ocho marcadores DALP analizados, dos resultaron ser polimórficos (diferenciales): DALP 232 y DALP 234, mostrando diferenciación a nivel intra e interpoblacional. El marcador DALP 232 resultó ser el más polimórfico, presentando trece bandas informativas entre las poblaciones; una de las cuales fue diagnóstica (exclusiva) para caracterizar a la población Tigre. Asimismo, el marcador DALP 234 mostró ocho bandas informativas, de las cuales una

banda fue diagnóstica para la población Ucayali.

VARIABILIDAD GENÉTICA INTRAPOBLACIONAL

En conjunto las cinco poblaciones naturales de camu-camu presentaron 45 genotipos, siendo que la población Putumayo presentó el mayor número de ellas (16), es decir la mayor diversidad genética. En tanto que Curaray presentó la menor diversidad genética con solamente cuatro genotipos (Figura 1). Estos resultados podrían ser explicado por la polinización alogámica facultativa (Villachica, H. 1996), el cual podría estar actuando en diferentes grados según el tamaño de las poblaciones. Así, las poblaciones Putumayo y Ucayali que presentan grandes tamaños poblacionales, presentan también las mayores diversidades genéticas. Esto podría deberse a que a mayor número de plantas mayor fecundación cruzada entre especímenes no parentales, lo cual contribuiría al mantenimiento de la diversidad genética dentro de la población a través del tiempo. En tanto que en poblaciones de menor tamaño como la del Curaray, la deficiente diversidad genética podría estar reflejando una fecundación cruzada entre individuos genéticamente relacionados (parietales), originada ya sea a por una reducción del tamaño poblacional (actual o una antigua), a una colonización a partir de pocos individuos o a la gran distancia geográfica entre poblaciones dentro de la misma cuenca. La literatura reporta también reducidos niveles de diversidad genética en *Eugenia dysenterica* (Myrtaceae) y su posible relación con la reducción de los tamaños poblacionales (Trinidad & Chaves, 2005).

VARIABILIDAD INTERPOBLACIONAL Y RELACIONES FILOGENÉTICAS ENTRE POBLACIONES DE CAMU-CAMU

Si bien los resultados del análisis factorial de correspondencia (AFC) muestran la conformación de tres agrupaciones constituidas únicamente por individuos de una sola población y una agrupación mixta conformada por los individuos de las poblaciones Napo y Curaray, más un individuo del Putumayo cuyos genotipos parecen estar más cercanamente relacionados (Figura. 2). Los valores obtenidos con el índice de fijación (F_{st}) y distancia genética (Tabla. 2) muestran que estas poblaciones se encuentran fuertemente estructuradas, es decir diferenciadas genéticamente (promedios: $F_{st} = 0.661$ y distancia genética = 1.129); siendo que las poblaciones más cercanamente relacionadas son Napo y Curaray ($F_{st} = 0.489$, distancia genética = 0.670), y las más distantes Tigre y Ucayali ($F_{st} = 0.805$, distancia genética = 1.635). La población del Tigre es la más distante de las demás poblaciones. Las relaciones genéticas entre las poblaciones pueden ser observadas en el árbol genético (Figura 3). La relación entre las poblaciones de Curaray y Napo es fuerte (Bootstrap = 100), al contrario de las otras relaciones que tienen un Bootstrap inferior a 50. En consecuencia las relaciones entre Tigre, Ucayali y Putumayo podrían variar dentro del árbol genético, siendo necesario en el futuro testar otros marcadores moleculares para obtener mayor consistencia en estas relaciones.

Reportes de la literatura, muestran que las poblaciones de plantas autóгамas están fuertemente estructuradas en líneas puras, en comparación de las plantas alógamas que generalmente presentan una estructuración menos definida (Jain, 1975; Loveless & Hamrick, 1984; Brown, 1990; Godt & Hamrick, 1998). El camu camu que presenta una polinización alógama facultativa (Peters & Vásquez, 1986; Barriga, 1994; Villachica, 1996; Flores, 1997), mostró con la técnica DALP una fuerte estructuración

genética entre las cinco poblaciones evaluadas. Estos niveles altos de diferenciación, podrían ser atribuidos a la restricción del flujo genético entre las poblaciones, debido principalmente a las grandes distancias geográficas existentes entre ellas. Estas distancias no podrían ser superadas por peces como la gamitana (*Colossoma macropomum*) y otras especies ictiológicas frugívoras (Villachica, 1996; Flores, 1997; Alves *et al.*, 2002) que son los posibles dispersores de sus semillas y poseen una migración limitada; o por los ungulados y monos que son más territorialistas.

El polimorfismo genético entre poblaciones puede ser un indicativo de adaptaciones evolutivas, que juegan un papel importante para la sobrevivencia de la población a los cambios medioambientales (Laci *et al.*, 2007). Sin embargo, en décadas recientes, el daño de los bosques con la consecuente fragmentación de los mismos, podría haber dificultado todavía más el flujo genético entre las poblaciones naturales de camu camu. La fragmentación de las poblaciones de camu camu y la disminución drástica de los agentes polinizadores ó dispersores de sus semillas bajo los efectos antropicos, causa a la larga una fuerte diferenciación genética entre las poblaciones de camu camu. Con el tiempo el funcionamiento en endogamia de poblaciones cada vez más pequeñas y aisladas, se acompañara de una erosión genética (pérdida de alelos).

Estos resultados nos permiten concluir que la diversidad genética dentro de las poblaciones de camu camu, depende del tamaño poblacional de las mismas, así como de su relación con otras poblaciones dentro de la misma cuenca. En tanto que la diferencia genética entre poblaciones de diferentes cuencas puede ser una consecuencia directa de las grandes distancias geográficas entre ellas, que sería un factor limitante en el flujo de genes entre las poblaciones entre las cuencas.

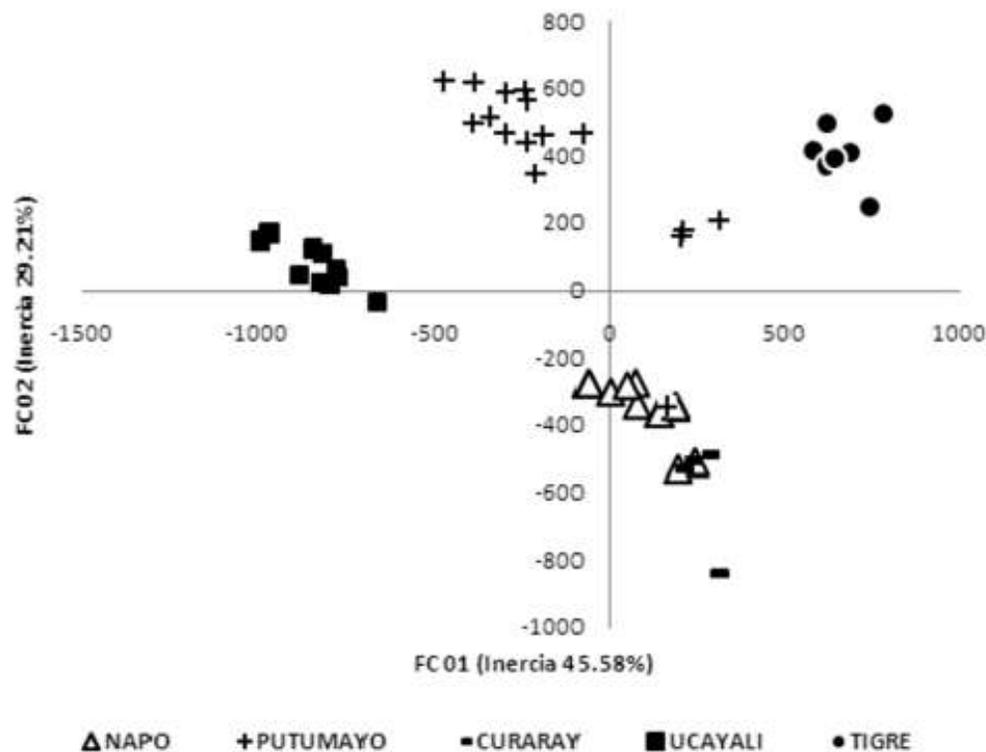


Figura 2. Representación gráfica de los resultados del Análisis Factorial de Correspondencia (AFC), inferidos en función a los genotipos encontrados para las cinco poblaciones naturales de camu camu *Myrciaria dubia* analizadas en la Amazonia peruana. Los puntos están distribuidos sobre un plano factorial bidimensional (ejes 1 y 2).

Tabla 1. Matriz del estimador F_{ij} (parte superior tabla) y distancia genética de Reynolds et al. (1983) (parte inferior tabla) para las cinco poblaciones naturales de camu camu *Myrciaria dubia* analizadas en la región Loreto.

POBLACIONES	NAPO	PUTUMAYO	CURARAY	UCAAYALI	TIGRE
NAPO	--	0.566***	0.489***	0.676***	0.757***
PUTUMAYO	0.835***	---	0.648***	0.539***	0.641***
CURARAY	0.670***	1.045***	---	0.715***	0.778***
UCAAYALI	1.128***	0.775***	1.254***	---	0.805***
TIGRE	1.416***	1.025***	1.504***	1.635***	---

*** significativo a $P < 0.001$

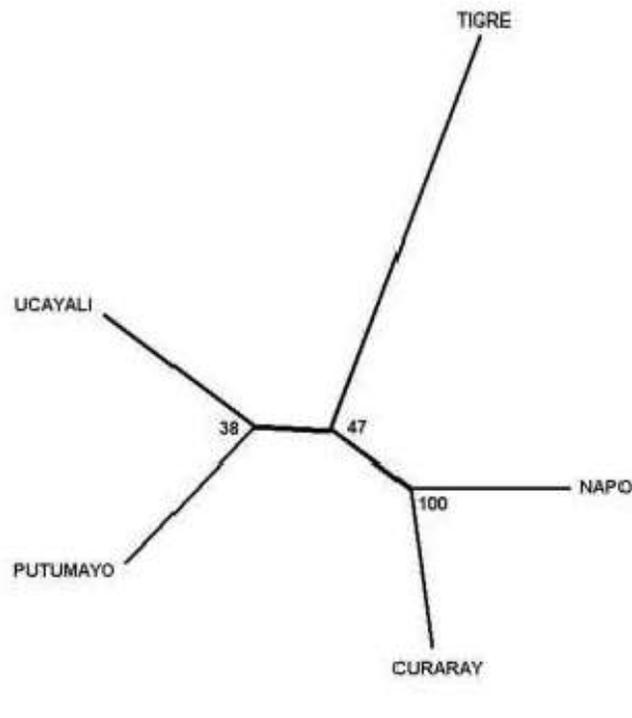


Figura 3. Dendrograma de similitud (UPGMA) generado con la distancia genética de Reynolds et al. (1983) para las cinco poblaciones de camu camu *Myrciaria dubia* analizadas en la región Loreto. Los números en los nudos de las ramas representan valores de Bootstrap para 1000.

AGRADECIMIENTO

Al Proyecto Innovación y Competitividad para el Agro Peruano – INCAGRO, por el financiamiento parcial del presente estudio a través del subproyecto “Mejoramiento genético del “camu camu” *Myrciaria dubia* para sistemas productivos de suelos inudables”.

BIBLIOGRAFÍA CITADA

- Alves, R. E.; Figueiras, H. A. C.; Moura, C. F. H.; Araujo, N. C. C.; Almeida, A. S. 2002. Camu camu (*Myrciaria dubia* Mc Vaugh): A rich natural source of vitamin C. *Proceed Interamerican Society for Horticultural*, 46:11-13.
- Barriga, R. 1994. Plantas Útiles de la Amazonia Peruana: Características, Usos y Posibilidades. Lima (Perú): CONCYTEC. p. 80- 84.
- Belkhir, K. ; Borsa, P. ; Chichi, I. ; Raufast, N. ; Bonhomme, F. 2004. GENETIX 4.05.2, logiciel sous windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire génome, populations, interactions, CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II, Montpellier, France.
- Brown, A. H. D. 1990. Genetic characterization of plant matrin systems. Brow AHD, Clegg MT, Kahler AL, Weir BS. Plant populations genetics, breeding, and genetic resources. Sinauer, Sunderland, Massachusetts. p. 145-162.
- Desmarais, E.; Laneluc, I.; Lagnel, J. 1998. Direct amplification of length polymorphisms (DALP) or how to get and characterize new genetic markers in many species. *Nucleic Acids Research*, 26(6):1458-1465.
- Doyle, J. J. ; Doyle, J. L. 1987. A rapid ADN isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19:11-15.
- Frankham, R.; Ballou, J.D.; Briscoe, D.A. 2008. Fundamentos de genética da conservação. Riberão preto-SP, SBG (sociedade Brasileira de Genética). 280pp.
- Felsenstein, J. 1993. PHYLIP (Phylogeny inference package) versión 3.05 general information manual. University of Washington, seattle, Washington. 132pp.
- Ferreira, M.; Grattapaglia, D. 1998. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética 3ª ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN. 220pp.

- Flores, S. 1997. Cultivo de Frutales Nativos Amazónicos. Manual para el Extensionista. En: *Tratado de Cooperación Amazónica*. Lima (Perú): Secretaría Pro Tempore. p. 55-62.
- Godt, M. J. W.; Hamrick, J. L. 1998. Allozyme diversity in the grasses. In: Cheplick GP. *Populations Biology of grasses*. Cambridge University press. p. 11-29
- Hansen, M.; Hallden, C.; Säll, T. 1998. Error rates and polymorphism frequencies for three RAPD protocols. *Plant Molecular Biology Reporter*, 16: 139-146.
- Hartl, D.; Clark, A. 1997. Principles of population genetics. Sinauer Associates, Inc. Publishers Sunderland, Massachusetts. 683pp.
- Jain, S. K. 1975. Populations structure and affects of breeding systems. In Frankel OH and Hawker JG. *Crop genetic resources for today and tomorrow*. Cambridge University Press. p. 15-36.
- Karp, A.; Kresovich, S.; Bhat, K.; Ayada, W.; Hodgkin, T. 1997. Molecular tool in plant genetic resources conservation: a guide to the technologies. IPCRI technical bulletin N° 2. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy. 60pp.
- Laci, S.; Björn, S.; Genlou, S. 2007. Microsatellite variability and heterozygote excess in *Elymus trachycaulus* from british Columbia in Canada. *Biochemical systematics and ecology*, 35: 725-736.
- Langar, K.; Lorieux, M.; Desmarais, E.; Griveau, Y.; Gentzbittel, L.; Berville, A. 2003. Combined mapping of DALP and AFLP markers in cultivated sunflower using F9 recombinant inbred lines. *Theoretical and Applied Genetics*, 106:1068-1074.
- Loveless, M. D.; Hamrick, J. L. 1984. Ecological determinants of genetic structure in plants populations. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 15: 69-95.
- Ma, Y.S.; Yu, H.; Li, Y-Y, Yan, H.; Cheng, X. 2008. A study of genetic structure of *Stephania yunnanensis* (Menispermaceae) by DALP. *Biochemical Genetics*, 46:227-240.
- Page, R. D. M. 1996. TREEVIEW, Tree drawing software for Apple Macintosh and Microsoft Windows. Division of Environmental and Evolutionary Biology, Institute of Biomedical and Life Sciences, University of Glasgow. Glasgow, Scotland, UK.
- Penn, J. W. 2006. The cultivation of camu camu (*Myrciaria dubia*): a tree planting programme in the Peruvian Amazon. *Forests, trees and livelihoods*, 16:85-101.
- Peters, Ch.; Vásquez, A. 1986. Estudios Ecológicos de Camu camu *Myrciaria dubia*. I. Producción de Frutos en Poblaciones Naturales. *Acta Amazónica* (16-17): 161-174.
- Pinedo, M.; Riva, R.; Rengifo, E.; Delgado, C.; Villacres, J.; Gonzáles, A.; Inga, H.; López, A.; Farroñay, R.; Vega, R.; Linares, C. 2001. Sistema de producción de camu-camu en restinga. Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana 141pp.
- Rodríguez, R. B.; de Menezes, H. C.; Carbral, L. M. C.; Domier, M.; Reynes, M. 2001. An Amazonian fruit with high potential as a source of vitamin C: The camu-camu (*Myrciaria dubia*): *Fruits*, 56(5): 345-354.
- Rojas, S.; Rodríguez, D.; Silva, M. L.; Astolfi, F. E. 2008. Desenvolvimento e mapeamento de microssatélites gênicos (EST-SSRs) de camu camu (*Myrciaria dubia* [H.B.K.] McVaugh). *Revista Corpoica: Ciência y Tecnología Agropecuaria* 9(1): 14-21.
- Sambrook, J.; Russell, D. 1991. *Molecular Cloning: A laboratory Manual*, 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Silva, M. L. 2006. *Estudo de genes expressos em fruto: de camu camu: sequenciamento de ESTs*. Tese doutorado, Universidade federal do Amazonas Amazonas, Brasil. 82pp.
- Trinidade, M. G.; Chaves, L. J. 2005. Genetic structure of natural *Eugenia dysenterica* DC (Myrtaceae) populations in northeastern Goiás, Brazil accessed by morphological traits and RAPD markers. *Genetic and molecular Biology*, 28(3): 407-413.
- Villachica, H. 1996. *Frutales y hortalizas promisorio: de la Amazonia*. Tratado de Cooperación Amazónica. Lima Perú. 367pp.
- Wahid, N.; Naydenov, K. D.; kamari, S.; Boulli, A.; Tremblay, F. 2010. Genetic structure of *Pinus pinaster* Ait. Populations in Morocco revealed by nuclear microsatellites. *Biochemical Systematics and Ecology*, 38: 73-82.
- Wang, R.; Wang, Y.; Lei, G.; Xu, R.; Painter, J. 2003. Genetic Differentiation Within Metapopulations of *Euphydryas aurinia* and *Melitaea phoebe* in China. *Biochemical Genetics*, 41: 3-4.
- Weir, B. S.; Cockerham, C. C. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure In: *Evolution*, 38:1358-1370.