



**UNAP**

**Facultad de  
Ciencias Forestales**

ESCUELA DE FORMACION PROFESIONAL DE INGENIERIA FORESTAL

TESIS

**“ANÁLISIS DE DIVERSIDAD GENÉTICA POBLACIONAL DE *Aniba rosaeodora*  
DUCKE “PALO DE ROSA” EN LA AMAZONÍA PERUANA EMPLEANDO  
MARCADORES ISSR”**

Tesis para optar el título de Ingeniero Forestal

Presentado por:

Stalin Juan Vasquez Guizado

Asesor:

Ing. Tedi Pacheco Gómez

Co Asesor:

Blgo. Juan Carlos Castro Gómez

Iquitos, Perú

2019



## ACTA DE SUSTENTACIÓN

### DE TESIS Nº 884

Los miembros del Jurado que suscriben, reunidos para evaluar la sustentación de tesis presentada por el bachiller **STALIN JUAN VASQUEZ GUIZADO**, titulada: "ANÁLISIS DE DIVERSIDAD GENÉTICA POBLACIONAL DE *Aniba rosaeodora* DUCKE "PALO DE ROSA" EN LA AMAZONIA PERUANA EMPLEANDO MARCADORES ISSR", formuladas las observaciones y analizadas las respuestas,

Lo declaramos:

APROBADO

Con el calificativo de:

MUY BUENO

En consecuencia queda en condición de ser calificado:

APTO

Y, recibir el Título de Ingeniero Forestal.

Iquitos, 06 de julio 2019

  
Ing. RONALD BURGA ALVARADO, Dr.  
Presidente

  
Ing. BENJAMIN SORIA SOLANO, M.Sc.  
Miembro

  
Ing. JUAN DE LA CRUZ BARDALES MELENDEZ, Dr.  
Miembro

  
Ing. TEDI PACHECO GÓMEZ, M.Sc.  
Asesor

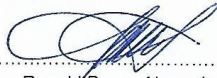
  
Blgo. JUAN CARLOS CASTRO GÓMEZ, Dr.  
Co-Asesor

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA AMAZONIA PERUANA  
FACULTAD DE CIENCIAS FORESTALES  
ESCUELA DE FORMACION PROFESIONAL DE INGENIERIA FORESTAL

ANÁLISIS DE DIVERSIDAD GENÉTICA POBLACIONAL DE *Aniba rosaeodora*  
DUCKE "PALO DE ROSA" EN LA AMAZONÍA PERUANA EMPLEANDO  
MARCADORES ISSR

Tesis sustentada y aprobada el 6 de julio del 2019, según acta de sustentación N° 884

MIEMBROS DEL JURADO



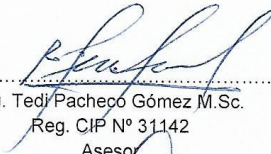
Ing. Ronald Burga Alvarado Dr.  
Reg. CIP N° 45725  
Presidente



Ing. Benjamin Soria Solano M.Sc.  
Reg. CIP N° 32679  
Miembro



Ing. Juan de la Cruz Bardales Melendez Dr.  
Reg. CIP N° 45893  
Miembro



Ing. Tedi Pacheco Gómez M.Sc.  
Reg. CIP N° 31142  
Asesor



Blgo. Juan Carlos Castro Gómez Dr.  
Reg. CBP N° 4783  
Co-Asesor

## **DEDICATORIA**

A Dios sobre todas las cosas, a Juliana Guizado Mariño (Mi Mama), a Estiber Alvaro Vasquez Guizado y Kevin Edhu Vasquez Guizado (Mis Hermanos), a Inés Guizado Mariño (Mi Tía), Honorata Guizado Mariño (Mi Tía), Bertha Guizado Mariño (Mi Tía), Teófilo Guizado Mariño (Mi Tío), Irene Guizado Mariño (Mi Tía) y a Faustina Mariño Cáceres (Mi Abuelita), por demostrarme que las metas se logran con mucha disciplina, perseverancia y humildad.

## AGRADECIMIENTO

Un agradecimiento especial a los profesores: Pedro Marcelino Adrianzen Julca, Jorge Luis Marapara del Águila, Jorge Angulo Quintanilla, Rodil Tello Espinoza y José David Urquiza Muñoz por su constante apoyo, asesoramiento y los consejos brindados durante toda mi formación y ahora en el desarrollo de la tesis.

Un agradecimiento a los investigadores de la Universidad Abant Izzet Bayzal (Turquía): Faheem Sahazaht Baloch, Fawad Ali, Mumamet Nadeem y Nuretin Baran, por la enseñanza que me brindaron en los análisis bioinformáticos.

A mi enamorada Esperanza Torres Canales por su ayuda en el aislamiento del ADN y las locuras y bonitos momentos que paso a su lado.

A mis amigos del CIRNA: Hicler Napoleón (El jefe), Jhoao Fasabi (Rocker), Jhon Vargas (Un pendejo), Bryan Orbe (El Enano) y Andry Mavila (La china), por el apoyo brindado en la fase experimental y las aventuras vividas en el laboratorio.

A mis amigos de la UNAP: Waldir Taype (El negro), Cesar Renato (Loco INEI), Santos Agreda (Marido), Marcelo Chavil (El positivo), Mac Álvarez (El brashico), Baltazar Araujo (Rosado), Miguel Aguilar (Timbalero), Cesar Manihuary (El loco), Angel Alvarado (Angelito), Jesús Esteves (Tino), Franz Gonzales (Limeño), Marjorie Tatiana (La pequeña), Gabriela Ríos (La loca), Pedro Vela (El pelotero) y el Señor Valdivia (El chef)

## INDICE

<b>DEDICATORIA</b>	iv
<b>AGRADECIMIENTO</b>	v
<b>LISTA DE TABLAS</b>	ix
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	x
<b>LISTA DE ANEXOS</b>	xi
<b>RESUMEN</b>	xii
<b>ABSTRACT</b>	xiii
<b>INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>I. MARCO TEÓRICO</b>	3
<b>1.1 Antecedentes</b>	3
1.1.1 Desarrollo tecnológico de los marcadores ISSR – PCR	3
1.1.2 Estudios moleculares aplicados a <i>Aniba rosaeodora</i> Ducke	4
<b>1.2 Bases teóricas</b>	4
1.2.1 Aislamiento de ADN genómico	4
1.2.2 Diversidad genética	5
1.2.3 Marcadores ISSR	6
<b>1.3 Definición de términos básico</b>	7
<b>II. HIPÓTESIS Y VARIABLES</b>	10
<b>2.1 Formulación de la hipótesis</b>	10
2.1.1 Hipótesis general	10

2.1.2 Hipótesis nula	10
2.1.3 Hipótesis alterna	10
2.2 Variables y su operacionalización	10
2.2.1 Identificación de variables	10
2.2.2 Operacionalización de variables	11
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>13</b>
3.1 Lugar de ejecución	13
3.2 Material botánico	13
3.3 Materiales y equipos	15
3.4 Metodología	16
3.4.1 Tipo y nivel de investigación	16
3.4.2 Población y Muestra	16
3.4.3 Diseño estadístico	16
3.4.4 Análisis estadístico	17
3.4.5 Procedimiento	20
3.5 Técnicas e instrumentos de recolección de datos	23
3.6 Técnicas de presentación de resultados	24
<b>IV. RESULTADOS</b>	<b>25</b>
4.1 Análisis electroforético y espectrofotométrico del ADN aislado	25
4.2 Amplificación ISSR – PCR y creación de la matriz binaria	26
4.3 Parámetros para análisis de la diversidad genética	27
4.4 Análisis poblacional de la diversidad genética	30

<b>V. DISCUSIÓN</b>	<b>34</b>
<b>5.1 Parámetros para análisis de la diversidad genética</b>	<b>34</b>
<b>5.2 Análisis poblacional de la diversidad genética</b>	<b>36</b>
<b>5.3 Implicaciones para la conservación del palo de rosa en la Amazonia     Peruana</b>	<b>40</b>
<b>VI. CONCLUSIONES</b>	<b>42</b>
<b>VII. RECOMENDACIONES</b>	<b>43</b>
<b>VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>44</b>
<b>IX. ANEXO</b>	<b>54</b>



**LISTA DE TABLAS**

Tabla 1: Operacionalización de los programas para cada indicador	12
Tabla 2: Secuencia y temperatura de alineamiento de los iniciadores ISSR	23
Tabla 3: Ratios de absorbancia y concentración de ADN por población	26
Tabla 4: Análisis de diversos parámetros de diversidad genética por iniciador	28
Tabla 5: Análisis de diversos parámetros de diversidad genética por población	29
Tabla 6: Flujo genético entre poblaciones de <i>Aniba rosaeodora</i> Ducke	29
Tabla 7: Diferentes parámetros de diversidad genética para tres grupos de <i>Aniba rosaeodora</i> Ducke	31
Tabla 8: Flujo genético entre grupos poblacionales de <i>Aniba rosaeodora</i> Ducke.	31
Tabla 9: El AMOVA revela una alta diferenciación dentro y entre poblaciones	31

**LISTA DE FIGURAS**

Figura 1: Mapa de distribución de <i>Aniba rosaeodora</i> Ducke	13
Figura 2: Muestras fértiles colectadas de <i>Aniba rosaeodora</i> Ducke	14
Figura 3: Muestras foliares para el aislamiento del ADN	15
Figura 4: Integridad del ADN revelado por la prueba electroforética	25
Figura 5: Amplificación del iniciador ISSR 826, en los genotipos (1-48)	27
Figura 6: Amplificación del iniciador ISSR 826, en los genotipos (49-90)	27
Figura 7: Agrupamiento basado en estructura de 90 genotipos de <i>Aniba rosaeodora</i> Ducke utilizando 11 iniciadores ISSR	30
Figura 8: Neighbor Joining de 90 genotipos de <i>Aniba rosaeodora</i> Ducke	32
Figura 9: Neighbor Joining de los tres grupos genéticos formados	33
Figura 10: Análisis principal de coordenadas de <i>Aniba rosaeodora</i> Ducke	33

**LISTA DE ANEXOS**

Anexo 1: Autorización de colecta de <i>Aniba rosaeodora</i> Ducke	55
Anexo 1: Constancia de identificación de <i>Aniba rosaeodora</i> Ducke	60
Anexo 2: Datos pasaporte de 90 genotipos de <i>Aniba rosaeodora</i> Ducke	61

## RESUMEN

*Aniba rosaeodora* Ducke “palo de rosa” es un árbol forestal amazónico en peligro de extinción, que posee “Linalool” un compuesto aromático con alto valor económico en la industria de la perfumería fina. Para evaluar la diversidad genética de esta especie se colectaron 90 genotipos provenientes de 8 poblaciones y se emplearon 11 marcadores ISSR. El ADN aislado fue de óptima calidad, así lo demuestra la prueba electroforética y espectrofotométrica. A partir de ello, se amplificaron 11 marcadores ISSR, obteniendo 375 bandas polimórficas y un PIC promedio de 0,774. El promedio del número efectivo de alelos ( $N_e$ ), la diversidad genética de Nei ( $H_e$ ) y el índice informativo de Shannon ( $I$ ) fue 1,485, 0,294 y 0,453 respectivamente. El resultado del AMOVA, reveló una alta variación genética dentro de las poblaciones (88%) y baja entre las poblaciones (12%). La estructura genética, el Neighbor Joining y el análisis principal de coordenadas, agruparon los 90 genotipos de *Aniba rosaeodora* Ducke en tres grupos (A, B y C). Se calcularon diversos parámetros de diversidad a nivel inter poblacional que reveló una mayor diversidad genética en el grupo A debido al mayor flujo de genes. El análisis Neighbor Joining unió los grupos A y B, mientras que el grupo C se encontró bastante divergente. La estructura genética, reveló que los genotipos Mairiricay (13 y 15) y Tamshiyacu 3, tienen un mayor nivel de diversidad genética. Finalmente, estos resultados son cruciales para planificar y diseñar estrategias de manejo y conservación de *Aniba rosaeodora* Ducke en la Amazonia Peruana.

**Palabras clave:** ISSR, diversidad genética, Neighbor Joining, AMOVA.

## ABSTRACT

*Aniba rosaeodora* Ducke "rosewood" is an Amazon forest tree in endangered, which has "Linalool" an aromatic compound with high economic value in the fine perfume industry. To evaluate the genetic diversity of this species, 90 genotypes from 8 populations were collected and 11 ISSR markers were used. The isolated DNA was of excellent quality, as demonstrated by the electrophoretic and spectrophotometric test. From this, 11 ISSR markers were amplified, obtaining 375 polymorphic bands and an average PIC of 0.774. The average of the effective number of alleles ( $N_e$ ), the genetic diversity of Nei ( $H_e$ ) and the informative index of Shannon ( $I$ ) were 1,485, 0,294 and 0,453 respectively. The result of the AMOVA revealed a high genetic variation within the populations (88%) and low among the populations (12%). The genetic structure, the Neighbor Joining and the main coordinate analysis, grouped the 90 genotypes of *Aniba rosaeodora* Ducke into three groups (A, B and C). Several diversity parameters were calculated at the inter-population level, which revealed a greater genetic diversity in the group A due to the greater gene flow. The Neighbor Joining analysis united groups A and B, while group C was found to be quite divergent. The genetic structure revealed that the Mairiricay (13 and 15) and Tamshiyacu 3 genotypes have a higher level of genetic diversity. Finally, these results are crucial to plan and design management and conservation strategies for *Aniba rosaeodora* Ducke in the Peruvian Amazon.

**Key words:** ISSR, genetic diversity, Neighbor Joining, AMOVA.

## INTRODUCCIÓN

La flora y fauna del mundo se enfrenta actualmente a una enorme pérdida de su hábitat, que se traduce en el agotamiento del número de poblaciones, algunas de las cuales llevan a la extinción (Mittermeier *et al.*, 2011, p. 5). La conservación de las especies de plantas no recibió la atención requerida en comparación con los animales, quizás a la falta de atractivo popular de la planta en comparación con los animales (Goettsch *et al.*, 2015, p. 1). Según la información compartida por el primer análisis global del riesgo de extinción en 2010, una de cada cinco especies de plantas del mundo está en peligro de extinción (Ibrahim *et al.*, 2013, p. 16833). Amazonas “Uno de los reservorios de diversidad biológica más rico del planeta” se extiende sobre una extensa área con una gran cantidad de hábitats y, en consecuencia, contiene una alta proporción de especies de árboles neo trópicos y un rico banco de genes y diversidad (Gentry, 1992, p. 20). *Aniba rosaeodora* Ducke, comúnmente conocida como palo de rosa, pertenece a la familia Lauraceae con  $2n = 24$  cromosomas (Contim *et al.*, 2005, p. 755), se encuentra en la región amazónica de Brasil, Guyana, Surinam, Perú, Colombia y Venezuela (Maia & Mourão, 2016, p. 195).

Para satisfacer la demanda mundial de aceite esencial, los árboles de palo de rosa se talaron a gran escala desde 1875 a 1975 en una proporción tal que las poblaciones naturales se agotaron significativamente (Bruleaux, 1989, p. 100). Esta sobreexplotación no solo disminuyó el número de la población de palo de rosa, sino que también la industria del aceite esencial se redujo drásticamente (May & Barata, 2004, p. 258). Hoy en día, Brasil es el principal productor de aceite esencial de palo de rosa, ya que se ha observado el manejo de rodales naturales y la disminución de la producción a partir de las poblaciones naturales de palo de rosa. A solicitud

del Brasil, el palo de rosa se incluye ahora como una especie en peligro de extinción en la base de datos CITES (Convención sobre el comercio internacional de especies en peligro de fauna y flora silvestres, lista II: CoP15; CITES, 2010).

Conversar los hábitats y la diversidad genética de cualquier especie son los principales objetivos de las políticas de conservación (Laikre, 2010, p. 350) y en la actualidad se están realizando serios esfuerzos para lograr la sostenibilidad en la industria del aceite esencial de palo de rosa a través de la recolección de germoplasma en los sitios de amenaza (Amusant, 2016, p. 508). Por lo tanto, es importante mencionar que los estudios de diversidad genética y estructura de la población son necesarios para planificar y diseñar estrategias de conservación y manejo, así como en la selección de diversos germoplasmas para el cultivo y el mejoramiento de las especies en el futuro (Baloch *et al.*, 2015, p. 163; Tabin *et al.*, 2016, p. 122).

Los marcadores moleculares han sido muy útiles para investigar la diversidad genética y para explorar la relación genética entre los genotipos de varios cultivos (Yaldiz *et al.*, 2018, p. 155). La información sobre la caracterización genética del palo de rosa usando los marcadores moleculares es muy escasa y la mayoría de los estudios se han realizado para explorar la actividad del aceite esencial. Del mismo modo, la información sobre la conservación de esta importante planta es casi no disponible. Por lo tanto, al considerar todos estos factores, la presente tesis tuvo como objetivo investigar la diversidad genética de *Aniba rosaeodora* Ducke “palo de rosa” de la Amazonia peruana empleando marcadores ISSR.

## I. MARCO TEÓRICO

### 1.1 Antecedentes

#### 1.1.1 Desarrollo tecnológico de los marcadores ISSR – PCR

Mullis (1990, p. 57), desarrolló la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y menciona que es una técnica muy importante para el estudio del ADN de cualquier organismo.

Zietkiewicz *et al.*, (1994, p. 177), desarrollaron las inter secuencias simples repetidas (ISSR), para ello utilizó la técnica PCR, donde generó gran cantidad de ampliaciones y permitió conocer la variación genética de una especie de una manera más simple y económica.

Hariri *et al.*, (2017, p. 106), estudiaron la diversidad genética de poblaciones naturales de *Indigofera tinctoria* L. en Indonesia, empleando marcadores ISSR. La diversidad encontrada dentro de las poblaciones fue baja (33%) y entre las poblaciones fue alta (63%).

Mohebodini *et al.*, (2017, p. 100), evaluaron la diversidad genética de *Portulaca oleracea* L “verdolaga iraní” utilizando marcadores ISSR. En la evaluación se emplearon 25 iniciadores ISSR, obteniendo un total de 92 bandas y 62 fueron polimórficas (67,4%). La diversidad encontrada en el germoplasma fue alta según el índice de Shannon donde se obtuvo un valor de 0,55.

Bozchaloyi *et al.*, (2017, p. 158), analizaron la diversidad genética de *Geranium robertianum* mediante marcadores ISSR. El estudio demuestra que las poblaciones geográficas de *G. robertianum* están bien diferenciadas tanto en contenido genético como características morfológicas.



### **1.1.2 Estudios moleculares aplicados a *Aniba rosaeodora* Ducke**

Santos *et al.*, (2007, p. 254), mencionaron que la generación de patrones RAPD para *Aniba rosaeodora* fue posible para hojas recogidas en tubos de polietileno con gránulos de sílice gel, siendo el ADN extraído con tampón de SDS. El ADN aislado tubo una adecuada calidad suficiente para generar patrones de RAPD en las condiciones mejoradas definidas para la PCR.

Santos *et al.*, (2008, p. 460), estudiaron patrones geográficos y diversidad genética en poblaciones naturales de *Aniba rosaeodora* en la Amazonia Central Brasileña. La colecta de muestras se realizó en cuatro poblaciones: Maues, Pirintins, Silves y Manaus. Treinta y cinco marcadores RAPD fueron utilizados de los cuales treinta y dos fueron polimórficos (91,4%).

Angrizani *et al.*, (2013, p. 1), desarrollaron y caracterizaron marcadores microsatélites de secuencia simple repetida (SSR, por sus siglas en inglés) para *Aniba rosaeodora* en la Amazonia Brasileña, muestreando las poblaciones de Manaus y Mues, para ello caracterizó 11 loci microsatélites.

## **1.2 Bases teóricas**

### **1.2.1 Aislamiento de ADN genómico**

Zhang *et al.*, (2013, p. 46), mencionan que el ADN es uno de los materiales genéticos más básicos y esenciales en el campo de la biología molecular. Hasta la fecha, el aislamiento de ADN suficiente y de buena calidad sigue siendo un desafío para muchas especies vegetales, aunque se han publicado varios métodos de extracción de ADN.

Sairkar *et al.*, (2013, p. 18), mencionan que los compuestos polifenólicos y polisacáridos también actúan como inhibidores durante el aislamiento del ADN

genómico a partir de hojas jóvenes de *Terminalia arjuna*, lo que resulta en la obtención de un ADN genómico de baja calidad, que afecta las aplicaciones posteriores como PCR, digestión de restricción, entre otros.

Pérez *et al.*, (2011, p. 28), mencionan que entre los protocolos de extracción del ADN más utilizados en diferentes especies se destaca el descrito por Dellaporta *et al.*, (1983, p. 19). Generalmente se realizan algunas modificaciones en la composición de tampón de extracción integrando un agente para estabilizar el pH a 8; una sal para disociar las proteínas; un detergente para solubilizar la membrana e inactivar la acción de algunas enzimas, y un inhibidor de la ADNasa para proteger el ADN. Los componentes más frecuentes para la degradación y rompimiento de las membranas celulares son dodecil sulfato sódico (SDS) (Dellaporta *et al.*, 1983, p. 20) bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) (Doyle, 1991, p. 285).

### **1.2.2 Diversidad genética**

Actualmente, la mayoría de los estudios que buscan analizar la diversidad genética se basan en el estudio de marcadores moleculares de ADN, los cuales permiten una precisa caracterización genotípica, superando las limitaciones que se presentan con el empleo de marcadores morfológicos y bioquímicos (Becerra & Paredes, 2000, p. 271).

La diversidad genética en sentido amplio es el componente más básico de la biodiversidad y se define como las variaciones heredables que ocurren en cada organismo, entre los individuos de una población y entre las poblaciones dentro de una especie ( Piñero *et al.*, 2008, p. 439). Así mismo la diversidad genética es la materia prima para la evolución. En términos generales, entre mayor diversidad genética presenta una especie en particular, tendrá mayores posibilidades de sobrevivir. Caso contrario, cuando no existe diversidad genética o es muy baja, la

probabilidad de que sobreviva a factores adversos, será menor; incluso, podría ocasionar su extinción (Adrianzen, 2007, p. 15).

Tradicionalmente, la diversidad de las especies ha sido estudiada mediante la observación metódica de caracteres morfológicos; sin embargo, es necesario citar que estos tienen una gran influencia del ambiente.

### **1.2.3 Marcadores ISSR**

Spooner (2005, p. 25), menciona que los ISSR, utiliza como herramienta de amplificación la PCR. Esto indica que la amplificación ocurrirá si existe un adecuado alineamiento de los iniciadores y la distancia entre éstos sea de 100 a 2500 pb, o más dependiendo de las condiciones PCR (Chia, 2009, p. 30). Por otro lado, la región no será amplificada (banda ausente) si existe divergencia entre los sitios de unión y los iniciadores, si uno de los sitios de unión no existe y/o si existen arreglos estructurales (genómicos o cromosómicos).

Los ISSR son técnicamente simples y no implican el mayor costo y laboriosidad de los AFLP, pero proporcionan un alto polimorfismo. Debido a que la secuencia del iniciador es pre-diseñada no requiere el conocimiento previo de las secuencias en el genoma. Así mismo, tienen una reproducibilidad aceptable y mayor que los RAPD.

Existen dos clases de iniciadores ISSR: no anclados y anclados. Los primeros poseen secuencia complementaria al microsatélite, pero no posee nucleótidos diferentes a éste. Así mismo, se han utilizado para medir las relaciones intra e inter específicas, como ha sido demostrado con diferentes especies por Bernet & Branchard (2001, p. 210). Los segundos poseen uno o varios nucleótidos diferentes (en posición 3' o 5') que posibilitan el alineamiento del iniciador en una posición específica con respecto al microsatélite y presentan dos lugares diferentes de

alineamiento para un mismo iniciador no anclado; es decir, que los iniciadores, dada su complementariedad total con la secuencia microsatélite, se podrían alinear a lo largo de éste, pudiendo variar de esta manera la longitud del producto amplificado. Los ISSR son interpretados como marcadores dominantes, es decir, que la presencia de la banda amplificada incluye a ambos de los siguientes caracteres: homocigoto dominante y heterocigoto, que son evaluados como uno solo y la banda ausente es considerada como el carácter homocigoto recesivo (Chia, 2009, p. 40). En otras palabras, sólo un alelo es detectado, que es el segmento amplificado, mientras que las demás variaciones alélicas son clasificadas conjuntamente como un alelo nulo. Esto trae la desventaja de observarse un bajo contenido de información genética por locus y por consiguiente no es posible determinar algunos parámetros genéticos.

Una vez que se han considerado cuidadosamente los puntos anteriores, iniciadores ISSR pueden ser diseñados o modificados para requisitos particulares para adaptarse a las necesidades del experimento. Alternativamente, divulgado previamente pueden usarse cartillas, con los iniciadores ISSR diseñados en la Universidad de British Columbia (nombres de impresión generalmente a partir de 'UBC') es una de las opciones más populares (Ng & Tan, 2015, p. 32).

### **1.3 Definición de términos básico**

**Diversidad genética:** Es generada por la meiosis reconstitucional, la poliploidía y posiblemente otros cambios en el genoma que pueden explicar la plasticidad morfo-fisiológica y la capacidad de las plantas para diferenciar y ocupar un territorio tan amplio y en diferentes condiciones ambientales (Dias *et al.*, 2018, p. 246).

**Polimorfismo:** Es la diferenciación que presentan los individuos en las poblaciones, el análisis del polimorfismo es mediante observación de presencia y ausencia de las bandas entre los individuos con el iniciador (Castro, 2010, p. 43).

***Aniba rosaedora* Ducke:** Es una especie de árbol amazónico en peligro de extinción que produce uno de los aceites esenciales más valiosos del mundo. La especie se utiliza en sistemas silvícolas que se consideran como un medio para reducir la presión de explotación de las poblaciones natural (Krainovic, 2017, p. 5).

**ISSR:** Las inter secuencias simples repetidas, son regiones en el genoma flanqueadas por secuencias de microsatélites. La amplificación por PCR de estas regiones usando un único iniciador produce múltiples productos de amplificación que pueden usarse como un sistema marcador multilocus dominante para el estudio de la variación genética en diversos organismos (Ng & Tan, 2015, p. 32).

**PCR:** La reacción en cadena de la polimerasa, es una técnica cuya misión es copiar millones de veces una secuencia específica de ADN blanco mediante una poderosa catálisis llevada a cabo por una enzima conocida como ADN polimerasa, de tal manera que cantidades pequeñas de ADN pueden ser sintetizadas y copiadas fielmente para analizarse con diferentes fines (Tamay de Dios *et al.*, 2013, p. 72).

**Electroforesis:** Es una técnica que permite visualizar la integridad de los ácidos nucleicos en un determinado tipo de gel, también requiere teñir con bromuro de etidio para su visualización con luz ultravioleta en un foto registro (Bermúdez *et al.*, 2016, p. 900).

**Espectrofotometría:** Es una técnica que permite cuantificar la concentración de ADN (ng/ $\mu$ L) y el grado de contaminación (pureza) en relación a los ratios  $A_{260/280}$  y

A<sub>260/230</sub>. Esta cuantificación se puede realizar en un Espectrofotómetro o NanoDrop (Bermúdez *et al.*, 2016, p. 902).

**AMOVA:** El análisis de la varianza molecular (AMOVA) es un método para estimar la diferenciación de la población directamente a partir de datos moleculares y probar hipótesis sobre dicha diferenciación. Una variedad de datos de marcadores moleculares (RFLP, AFLP, RAPD, ISSR, SSR, SNP, entre otros), pueden analizarse utilizando este método (Excoffier, *et al.*, 1992, p. 481).

**Neighbor Joining:** es un método que está relacionado con el método de agrupación pero que no requiere que los datos sean ultra métrico. El método es especialmente adecuado para conjuntos de datos que comprenden linajes con tasas de evolución muy diversas. Puede usarse en combinación con métodos que permiten la corrección de sustituciones superpuestas (Saitou & Nei, 1987, p. 408).

**Flujo de genes:** es el proceso de transferencia de genes de una población a otra, o entre dos o más poblaciones, e implica la dispersión de nuevas variantes genéticas entre poblaciones diferentes (Kasture *et al.*, 2016, p. 114).

**Intra poblacional:** se establecen entre organismos de la misma especie, que se dan en una población determinada, dentro de un hábitat determinado (Coelho *et al.*, 2017, p. 384).

**Inter poblacional:** se desarrolla entre poblaciones de organismos de la misma especie (Coelho *et al.*, 2017, p. 384).

## II. HIPÓTESIS Y VARIABLES

### 2.1 Formulación de la hipótesis

#### 2.1.1 Hipótesis general

Existe una baja diversidad genética poblacional de *Aniba rosaeodora* Ducke “palo de rosa” en la Amazonia peruana revelado con marcadores ISSR.

#### 2.1.2 Hipótesis nula

Existe una alta diversidad genética poblacional de *Aniba rosaeodora* Ducke “palo de rosa” en la Amazonia peruana revelado con marcadores ISSR.

#### 2.1.3 Hipótesis alterna

La diversidad genética poblacional de *Aniba rosaeodora* Ducke “palo de rosa” en la Amazonia peruana puede ser revelado con marcadores ISSR.

### 2.2 Variables y su operacionalización

#### 2.2.1 Identificación de variables

Se analizó la diversidad genética poblacional de *Aniba rosaeodora* Ducke “palo de rosa” en la Amazonia peruana empleando marcadores ISSR, teniendo en cuenta lo siguiente:

La variable independiente, estuvo en función de la población, siendo el indicador la ubicación geográfica y el índice el rango de coordenadas que comprende esta área (Latitud: 2°12'21'' - 10°03'06''S y Longitud: 71°45'29'' - 74°16'45''W).

Por otro lado, la variable dependiente, estuvo en función de los siguientes indicadores: contenido de información polimórfica, número efectivo de alelos, índice informativo de Shannon, diversidad genética de Nei, flujo de genes, distancia

genética (DGj), estructura genética, análisis molecular de varianza (AMOVA), árbol Neighbor Joining y análisis principal de coordenadas (PCoA).

### **2.2.2 Operacionalización de variables**

Una vez terminada la colecta de muestras botánicas de *Aniba rosaeodora* en la Amazonia peruana, se procedió a aislar el ADN genómico el cual se amplificó con 11 marcadores de inter secuencias simples repetidas (ISSR) mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR). A partir de esa amplificación se evaluó: el tamaño en pares de bases (bp) de cada amplicón, el cual se calculó de acuerdo a la frecuencia de migración con respecto al marcador de peso molecular, este fluctuó de 100 a 3000 bp.

PopGene ver. 1.32 se usó para estimar varios parámetros importantes de diversidad genética, incluidos el número de alelos efectivos ( $N_e$ ), el índice de información de Shannon ( $I$ ), la diversidad de genética de Nei ( $H_e$ ) y el flujo genético ( $N_m$ ). El contenido de información de polimorfismo (PIC) se calculó para cada marcador ISSR de acuerdo a lo sugerido por Baloch *et al.*, (2015, p. 163). El flujo de genes entre las poblaciones se calculó siguiendo la metodología sugerida por Hou & Lou (2011, p. 1). PopGene ver. 1.32 también se usó para estimar varios índices importantes de diversidad genética entre poblaciones como software de estadística, el cual fue usado para calcular la distancia genética (DGj) medida por Jaccard (1908, p. 223). GenAlEx v6.5 se usó para el análisis de varianza molecular (AMOVA) y análisis de coordenadas principales (PCoA). Para explorar la relación filogenética en palo de rosa, se realizó el Neighbor Joining utilizando el software Rstudio. Siguiendo la metodología evaluada por Evanno *et al.*, (2005, p. 2615), se aplicó el modelo de agrupamiento bayesiano para investigar la estructura genética del palo de rosa. El período inicial de formato se estableció en 5000 con 100,000



iteraciones de MCMC (Cadena de Markov Monte Carlo) sin información previa sobre el origen de los individuos y se estableció un total de diez ejecuciones independientes para cada valor de K, y para cada ejecución. Se trazó el número de clusters (K) contra la probabilidad del logaritmo en relación con la desviación estándar ( $\Delta K$ ). La asignación final de genotipos individuales se basó en que la magnitud del coeficiente de membresía es mayor o igual al 50% como lo sugiere (Habyarimana, 2016, p. 127) (Tabla 1).

Tabla 1: Operacionalización de los programas para cada indicador

<b>Programa</b>	<b>Indicador</b>
Microsoft Excel 2016	Contenido de información polimórfica (PIC)
	Numero efectivo de alelos ( $N_e$ )
PopGene ver. 1.32	Diversidad genética de Nei ( $H_e$ )
	Índice informativo de Shannon (I)
	Flujo genético ( $N_m$ )
Rstudio	Coefficiente de similitud de Jaccard
	Árbol Neighbor Joining
MEGA X	Editar el Árbol Neighbor Joining
GenAlEx v6.5	Análisis molecular de varianza (AMOVA)
	Análisis principal de coordenadas (PCoA)
STRUCTURE	Estructura genética

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Lugar de ejecución

El presente trabajo se desarrolló en la Unidad Especializada de Biotecnología (UEB) del Centro de Investigaciones de Recursos Naturales de la Amazonia de la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana (CIRNA - UNAP). Ubicado en el pasaje los Paujiles S/N del AAHH. Nuevo San Lorenzo, Distrito de San Juan Bautista, Provincia de Maynas, Región de Loreto.

#### 3.2 Material botánico

La colecta de material botánico de *Aniba rosaeodora* Ducke se realizó en 2 regiones de la Amazonía Peruana (Loreto y Ucayali), estas regiones abarcan 6 distritos y 8 poblaciones (Figura 1).



Figura 1: Mapa de distribución de *Aniba rosaeodora* Ducke

El proceso de colecta abarcó dos actividades: La primera fue coleccionar el material botánico fértil por triplicado, el cual se colocó en papel periódico y luego preservado en alcohol de 70°, seguido fueron llevados al Herbarium Amazonense de la UNAP, para su correcta identificación a nivel de especie (Figura 2).



Figura 2: Muestras fértiles colectadas de *Aniba rosaeodora* Ducke

Segundo, fue coleccionar en promedio de diez hojas jóvenes del árbol y colocarlas en una bolsa con cierre hermético y dentro de un contenedor con hielo, estas hojas fueron utilizadas para el aislamiento del ADN en la UEB – CIRNA (Figura 3).



Figura 3: Muestras foliares para el aislamiento del ADN

### 3.3 Materiales y equipos

**Equipos:** Balanza digital, baño maría, cámara de electroforesis horizontal, cámara de flujo laminar, congelador de  $-20^{\circ}\text{C}$ , destilador, fuente de poder para electroforesis, NanoDrop 2000c, transiluminador UV Imagen Gel, cronometro, micro centrifuga, termociclador, autoclave, horno microondas, impresora láser y laptop.

**Materiales:** Agitador magnético, espátulas, pinzas y tijeras, gradillas y soporte para tubos eppendorf, guantes de vinilo, pipetas, matraces, tips, micro pipetas, placas PCR de 96 pocillos con tapa, probeta, puntas plásticas, tubos para micro centrifuga, vortex, pilones y papel de aluminio.

**Material químico:** Ácido bórico, agarosa, agua destilada,  $\beta$ -mercaptoetanol, proteinasa K, dodecil sulfato sodico (SDS), bromuro de etidio, bromuro de hexadeciltrimetil amonio (CTAB), cloroformo – alcohol isoamilico (24:1), cloruro de sodio, cloruro de potasio, acido etilendiaminotetra acético (EDTA), etanol absoluto,

isopropanol, polivinil pirrolidona (PVP-40), acetato de sodio, 2-propanol, carbón activado, ladder 100 bp y tris base.

**Enzimas:** ADN polimerasa (TaqPoly), ARNasa y dNTPs.

**Software:** Microsoft office professional plus 2013, PopGene ver. 1.32, Software Rstudio, GenAIEx v6.5, MEGA-X, STRUCTURE.

### 3.4 Metodología

#### 3.4.1 Tipo y nivel de investigación

**Tipo de investigación:** Descriptivo - Analítico, el cual consiste fundamentalmente, en analizar la diversidad genética empleando marcadores moleculares ISSR.

**Nivel de investigación:** No experimental, transversal y descriptivo. Porque no se manipularon las variables, se analizaron los datos en un único momento, y se describieron los rasgos genéticos más importantes de las diferentes poblaciones de *Aniba rosaeodora* Ducke en la Amazonía Peruana.

#### 3.4.2 Población y Muestra

**Población:** Todos los individuos de *Aniba rosaeodora* Ducke presentes en la Amazonía Peruana.

**Muestra:** Se basó en seleccionar los individuos de *Aniba rosaeodora* Ducke que fueron más accesibles para coleccionar el material botánico. Esto se realizó considerando los pocos individuos identificados en cada población.

#### 3.4.3 Diseño estadístico

El diseño es no experimental, dentro de la categoría transeccionales o transversales (donde se analizaron los datos en un único momento). Es decir, se analizaron las poblaciones de *Aniba rosaeodora* Ducke en base al marcador ISSR en un momento determinado.

### **3.4.4 Análisis estadístico**

#### **Formación de la matriz binaria**

Se construyó la matriz binaria en función de las ampliaciones, para ello se empleó el programa Microsoft Excel 2013. Esta matriz considero las bandas ausentes y presentes con el valor de 1 y 0, respectivamente. Para el análisis únicamente fueron considerados aquellas bandas fuertes y claras, siendo eliminados las tenues o dudosas. Para mantener un registro correcto del tamaño de cada banda, este se comparó con un marcador de peso molecular. Este marcador es de 1kb y su rango de variación es de 100 a 3000 bp.

#### **Contenido de información polimórfica (PIC)**

Es una medida relativa de la informatividad de un marcador genético, que depende del número de alelos de ese marcador y de sus frecuencias relativas en la población. A partir de la construcción de la matriz binaria es posible calcular el PIC, para ello se empleó el programa Microsoft Excel 2013, siguiendo lo propuesto por (Baloch *et al.*, 2015, p. 165). El resultado se colocó en una tabla teniendo en consideración el tipo de iniciador.

#### **Numero efectivo de alelos (Ne)**

Es el número de alelos igualmente frecuentes que se necesitarían para lograr la misma heterocigosidad esperada en la población estudiada. Para calcular este parámetro de diversidad genética se empleó el software PopGene ver 1.32, los resultados mostrados están en función del análisis para cada marcador ISSR.

#### **Índice informativo de Shannon (I)**

Se aplica ampliamente para cuantificar el grado de polimorfismo de banda proporcionado por los patrones de bandas. En función de ello se utilizó el software

PopGene ver 1.32, para cuantificar este parámetro. Así mismo el cálculo responde a la siguiente formula:

$$I = - \sum p_i * \log_2 p_i$$

Donde se entiende que i) la población es grande, ii) se produce apareamiento al azar, iii) la población está aislada de otras, y iv) los efectos de la migración, la mutación y la selección no son relevantes. Debido a estos puntos, las estadísticas de frecuencia de alelos se complementan comúnmente con otra estimación que permite la distorsión del HWE (Equilibrio Hardy - Weinberg).

### **Diversidad genética de Nei (He)**

Es la fracción estimada de todos los individuos que podrían ser heterocigóticos para cualquier locus tomado al azar. Así mismo, este se calcula a partir de las frecuencias génicas. En función de ello se utilizó el software PopGene ver 1.32, para cuantificar este parámetro.

### **Flujo genético (Nm)**

Es el producto del tamaño efectivo de las poblaciones individuales (N) y la tasa de migración entre ellas (m). Sin embargo, es difícil medir la velocidad del flujo de genes directamente mediante el seguimiento de individuos y también inferir matemáticamente su valor (Hou & Lou, 2011, p. 1).

$$Nm = 0,5 * (1 - G_{st} / G_{st})$$

El flujo de genes entre poblaciones fragmentadas está relacionado con la capacidad de dispersión, por lo que se espera que proporcione información sobre la capacidad de dispersión del organismo y el grado de aislamiento entre las poblaciones. En función de ello se utilizó el software PopGene ver 1.32, para cuantificar este parámetro  $G_{st}$ .

### **Coefficiente de similitud de Jaccard (J)**

Para el cálculo de este coeficiente se empleó el software Rstudio, el cual estuvo basado en la matriz binaria. Es importante mencionar que este coeficiente se representa con la siguiente formula:

$$J = a / (a + b + c)$$

Donde a = número de alelos comunes entre dos individuos; b = número de alelos únicos en el individuo 1 y c = número de alelos únicos en el individuo 2. El coeficiente de Jaccard solo tiene en cuenta las bandas presentes en al menos uno de los dos individuos. Por lo tanto, no se ve afectado por las bandas ausentes homoplásicas (donde la ausencia de la misma banda se debe a mutaciones diferentes). Es importante mencionar que a partir del coeficiente de similitud de Jaccard se calcula la distancia genética (DGj), el cual es la base para los análisis inter poblacionales.

### **Análisis molecular de varianza (AMOVA)**

Con los datos obtenidos del coeficiente de similitud de Jaccard y empleando el programa GenAlEx v6.5 se calculó el AMOVA, el cual nos permitió cuantificar las variabilidades genéticas dentro y entre las poblaciones.

### **Estructura genética**

Del mismo modo, la estructura genética fue construido basado en el coeficiente de similitud de Jaccard y empleando el software STRUCTURE.

### **Agrupamiento Neighbor Joining**

Este agrupamiento se construyó basados en el coeficiente de similitud de Jaccard. Para ello se empleó el software Rstudio y para la edición el software MEGA-X.



### **3.4.5 Procedimiento**

#### **3.4.5.1 Permiso de colecta e identificación de la especie**

Se solicitó el permiso de colecta del material botánico al SERFOR (Servicio Nacional Forestal y de Fauna Silvestre), debido a que la especie esta categorizada como vulnerables a nivel nacional. En base a ello, se presentó la solicitud y los documentos requeridos. El permiso de colecta fue autorizado 30 días después de presentado los documentos (Anexo 1).

Por otro lado, la identificación a nivel de especie se realizó en el Herbarium Amazonense de la UNAP, para ello se llevó las exicatas de cada individuo muestreado para su identificación. Adicionalmente se presentó una solicitud y se adjuntó el permiso de colecta emitido por el SERFOR. El certificado de la identificación de la especie se entregó 30 días después de presentado los documentos (Anexo 2).

#### **3.4.5.1 Preparación de soluciones y reactivos**

**Buffer I CTAB:** 300 mM Tris-HCl (pH 8.5), 25 mM Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), 2 M NaCl, 2% Cetiltrimetil ammonio bromuro (CTAB), 3% Polivinil pirrolidona (PVP-40).

**Buffer II SDS:** 300 mM Tris-HCl (pH 8.0), 3% SDS, 3% PVP-40, 100 mM EDTA y 2 M NaCl.

Tanto el buffer I y II fueron mezclados en una proporción de 75 % y 25 %, además, a la mezcla se agregó, 25  $\mu$ L de 2-mercapto etanol, 10  $\mu$ L de proteinaza K y por separado 75  $\mu$ L de carbón activado.

### 3.4.5.2 Aislamiento de ADN

Para el aislamiento de ADN se empleó el protocolo modificado de Castro *et al.*, (2017, p. 18), el cual es detallado a continuación:

1. En un mortero se agregó 50 mg de tejido foliar fresco, y 750  $\mu$ L de buffer de extracción CTAB y SDS (precalentado a 65 °C), y 50  $\mu$ L de carbón activado. La muestra se molió por compeso por ~ 6 minutos, 1 mL de la muestra molida se transfirió a tubos de micro centrifuga, luego se incubo en baño maría a 65 °C por ~ 12 minutos, con homogenización por inversión cada 4 minutos. Luego se atemperó y se agregó 1 mL de cloroformo alcohol isoamílico (CI) 24:1, se homogenizo en vortex y luego se centrifugo a 14000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente (TA).
2. Luego la fase acuosa superior (700  $\mu$ L) se transfirió a micro tubos de 2 mL y se agregó lentamente 0,3 volúmenes de etanol absoluto, se homogenizo por inversión lenta ~ 8 a 10 veces, luego se agregó 1 mL de CI, se homogenizó en vortex y se centrifugó a 14 000 rpm por 10 minutos a TA.
3. La fase acuosa superior (~ 1 000  $\mu$ L) se transfirió a micro tubos de 2 mL y 1 mL CI se añadió, se homogenizo en vortex y se centrifugo como se ha descrito previamente.
4. La fase acuosa superior (750  $\mu$ L) se transfirió a micro tubos de 1.5 ml, se agregó 75  $\mu$ L de acetato de sodio y 675  $\mu$ L de 2-propanol, se homogenizó lentamente hasta observar una sola fase. Seguidamente se incubo a -20°C por 30 minutos. Luego se centrifugó a 14 000 rpm x 25 min a TA.
5. Se descartó la fase superior y el precipitado (pellet) formado, se lavó con etanol (500  $\mu$ L) de 70% a 14 000 rpm por 5 minutos a TA. (dos veces).

6. Finalmente se descartó el etanol y el sedimento de ácido nucleico se secó en un termo block a 50°C por 3-5 minutos, se disolvió en 35 - 50 µl de buffer TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0), y se almacenó a -80°C.

#### **3.4.5.3 Análisis cuantitativo y cualitativo del ADN genómico**

La calidad y cantidad del ADN purificado se determinó mediante medición estándar de la densidad óptica (OD), registrando los ratios de OD  $A_{260} / A_{230}$  y  $A_{260} / A_{280}$  usando un espectrofotómetro UV-Vis NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, de EE. UU.). La integridad del ADN se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa. Para el ensayo, el ADN total se mezcló con un tampón de carga 2X (SDS al 0,01%, azul de bromofenol al 0,01% y EDTA 0,5 mM). Esta mezcla se cargó en gel de agarosa al 1,5% (w/v). Luego, la corrida electroforética se realizó utilizando un voltaje de funcionamiento de hasta 8 V / cm y 1X buffer TBE, teñido con bromuro de etidio y visualizado con luz ultravioleta.

#### **3.4.5.4 Amplificación por PCR con iniciadores ISSR**

Se emplearon once iniciadores ISSR, para la amplificación de las 90 muestras *Aniba rosaeodora* Ducke (Tabla 2). Para realizar la amplificación se utilizó la técnica de PCR, que contiene 5 ng/µL de ADN, 0,2 µL de Taq ADN polimerasa (Thermo Scientific), 4 µL dNTP's (Thermo Scientific), 1 µL del iniciador ISSR, 2,5 µL 1x PCR buffer (Thermo Scientific) y 2 µL MgCl<sub>2</sub>. El volumen de reacción se ajustó a 25 µL usando agua estéril de grado HPLC. La amplificación se llevó a cabo utilizando un termociclador Réflex programado durante 30 ciclos de 94 °C por 1 minuto, 50 - 52 °C (dependiendo de la temperatura del iniciador) por 1 minuto, 72 °C por 1 minuto, seguido de un ensayo final de extensión de 72 °C durante 10 minutos. Los productos amplificados de la PCR se resolvieron en gel de agarosa 1,8 % a 120 V por 240 minutos, en buffer TE 0,5X. El bromuro de etidio (0,1 mg/ml) fue usado para

desarrollar la tinción en el gel y pueda visualizarse y fotografiarse usando el UV Imager Gel Doc XR+ system (Bio-Rad, USA). Para medir por comparación los fragmentos amplificados se usó 2  $\mu$ L del marcador de peso molecular 100 bp (Promega, Madison, South Dakota, USA).

Tabla 2: Secuencia y temperatura de alineamiento de los iniciadores ISSR.

N°	Iniciador	Secuencia	Alineamiento (°C)
1	807	AGAGAGAGAGAGAGAGT	50
2	810	GAGAGAGAGAGAGAGAT	50
3	812	GAGAGAGAGAGAGAGAA	50
4	814	CTCTCTCTCTCTCTA	50
5	815	CTCTCTCTCTCTCTG	52
6	817	CACACACACACACAAA	50
7	818	CACACACACACACAG	52
8	819	GTGTGTGTGTGTGTGTA	50
9	826	ACACACACACACACAG	52
10	834	AGAGAGAGAGAGAGAGYT	52
11	840	GAGAGAGAGAGAGAGAYT	52

### 3.5 Técnicas e instrumentos de recolección de datos

Las bandas ISSR integras y bien definidas se anotaron manualmente utilizando el sistema binario, considerando presente (1) y ausente (0). Las bandas débiles no se calificaron para evitar anotaciones de bandas artificiales. PopGene ver. 1.32 se usó para estimar varios parámetros importantes de diversidad genética, incluidos el número de alelos efectivos ( $N_e$ ), el Índice de Información de Shannon (I) y la diversidad de genética de Nei ( $H_e$ ). El contenido de información de polimorfismo (PIC) se calculó para cada marcador ISSR de acuerdo a lo sugerido por Baloch *et al.*, (2015, p. 163). El flujo de genes entre las poblaciones se calculó siguiendo la metodología sugerida por Hou & Lou (2011, p. 1). PopGene ver. 1.32 también se usó para estimar varios índices importantes de diversidad genética entre

poblaciones como software de estadística, el cual fue usado para calcular la distancia genética (DGj) medida por Jaccard (1908, p. 223). GenAlEx v6.5 se usó para el análisis de varianza molecular (AMOVA) y análisis de coordenadas principales (PCoA). Para explorar el nivel de diversidad en el palo de rosa, se realizó el Neighbor Joining utilizando el software Rstudio. Siguiendo la metodología evaluada por Evanno *et al.*, (2005, p. 2615), se aplicó el modelo de agrupamiento bayesiano para investigar la estructura genética del palo de rosa. El período inicial de formato se estableció en 5000 con 100,000 iteraciones de MCMC (Cadena de Markov Monte Carlo) sin información previa sobre el origen de los individuos y se estableció un total de diez ejecuciones independientes para cada valor de K, y para cada ejecución. Se trazó el número de clusters (K) contra la probabilidad del logaritmo en relación con la desviación estándar ( $\Delta K$ ). La asignación final de genotipos individuales se basó en que la magnitud del coeficiente de membresía es mayor o igual al 50% como lo sugiere (Habyarimana, 2016, p. 127).

### **3.6 Técnicas de presentación de resultados**

Los resultados se presentaron básicamente mediante tablas y figuras. Las tablas mostraron los siguientes resultados: las características de cada uno de los genotipos, los datos espectrofotométricos, los parámetros de diversidad genética (Índice de Shannon (I), número efectivo de alelos ( $N_e$ ), diversidad genética de Nei y flujo genético ( $N_m$ )) y los resultados del AMOVA (variación genética dentro y entre poblaciones). Con respecto a las figuras mostraron los siguientes resultados: el mapa de distribución de las poblaciones de *Aniba rosaeodora* Ducke, las bandas de ADN genómico, la amplificación de los iniciadores ISSR, la estructura genética, el agrupamiento Neighbor Joining y el análisis de coordenadas principales (PCoA).

## IV. RESULTADOS

### 4.1 Análisis electroforético y espectrofotométrico del ADN aislado

El protocolo empleado en el aislamiento del ADN proporciono buenos resultados con respecto al análisis electroforético y espectrofotométrico. Con respecto al primero, se puede observar para cada una de las muestras, una banda integra y bien definida, y comparándolo con el marcador de peso molecular, esta banda tiene un tamaño de ~ 29 976 bp (Figura 4).

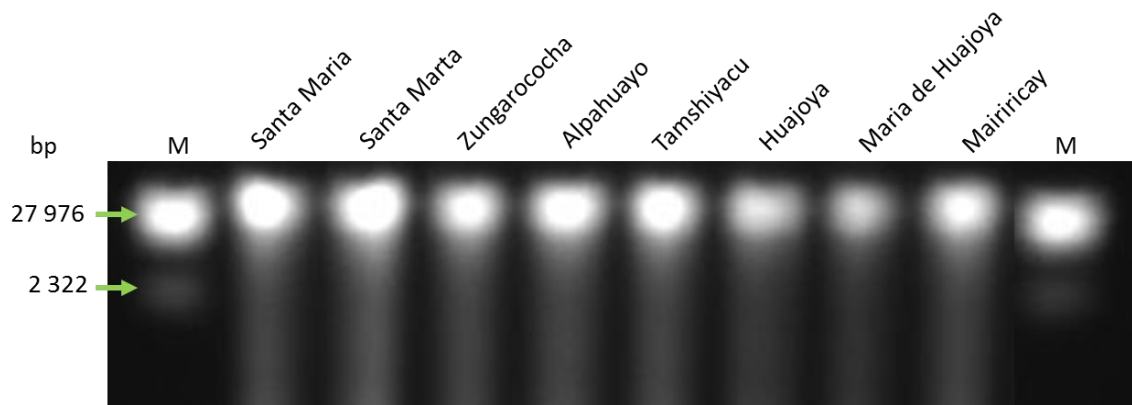


Figura 4: Integridad del ADN revelado por la prueba electroforética

Por otro lado, el análisis espectrofotométrico indica que el ADN genómico de las muestras aisladas está libre de contaminantes, como lo demuestra los ratios de absorbancia, obteniéndose en promedio  $A_{260/280}$  ( $2,10 \pm 0,18$ ) y  $A_{260/230}$  ( $2,09 \pm 0,13$ ). Así mismo, la concentración es adecuada para la amplificación por PCR, obteniéndose en promedio ( $246,5 \pm 84,1$  ng/ $\mu$ l) (Tabla 3).

Tabla 3: Ratios de absorbancia y concentración de ADN por población

<b>Población</b>	<b>A<sub>260/230</sub></b>	<b>A<sub>260/280</sub></b>	<b>Concentración (ng/μl)</b>
Huajoya	2,16	2,02	261,33
Maria de Huajoya	2,29	2,02	249,01
Mairiricay	2,06	2,15	228,67
Santa Marta	2,04	2,15	250,57
Santa Maria	2,19	2,03	221,90
Zungarococha	1,99	2,02	344,95
Alpahuayo	2,01	2,06	231,64
Tamshiyacu	2,04	2,15	235,69
<b>Promedio</b>	<b>2,09</b>	<b>2,10</b>	<b>246,5</b>
<b>Desv. Estand.</b>	<b>0,13</b>	<b>0,18</b>	<b>84,10</b>

#### 4.2 Amplificación ISSR – PCR y creación de la matriz binaria

La amplificación por PCR de estos 11 iniciadores ISSR, mostro bandas integras y bien definidas, observándose un buen nivel de polimorfismo por cada iniciador, lo cual es satisfactorio para el genotipado de *Aniba rosaeodora* Ducke. A partir de este resultado se creó la matriz binaria (1/0), observándose que la mayor y menor cantidad de bandas lo presentaron los iniciadores ISSR 826 y ISSR 819 con 51 y 10 bandas, respectivamente (Figura 5 - 6).

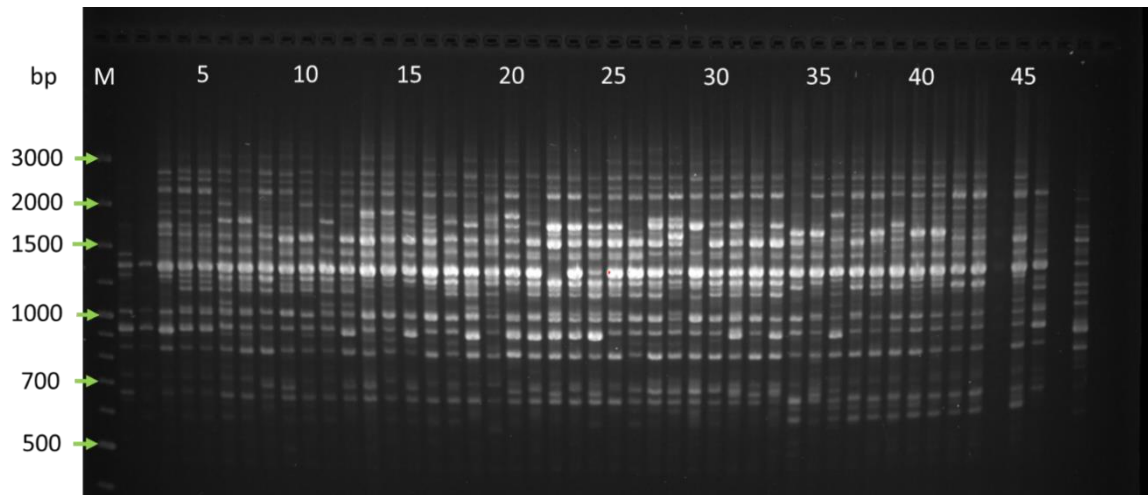


Figura 5: Amplificación del iniciador ISSR 826, en los genotipos (1-48)

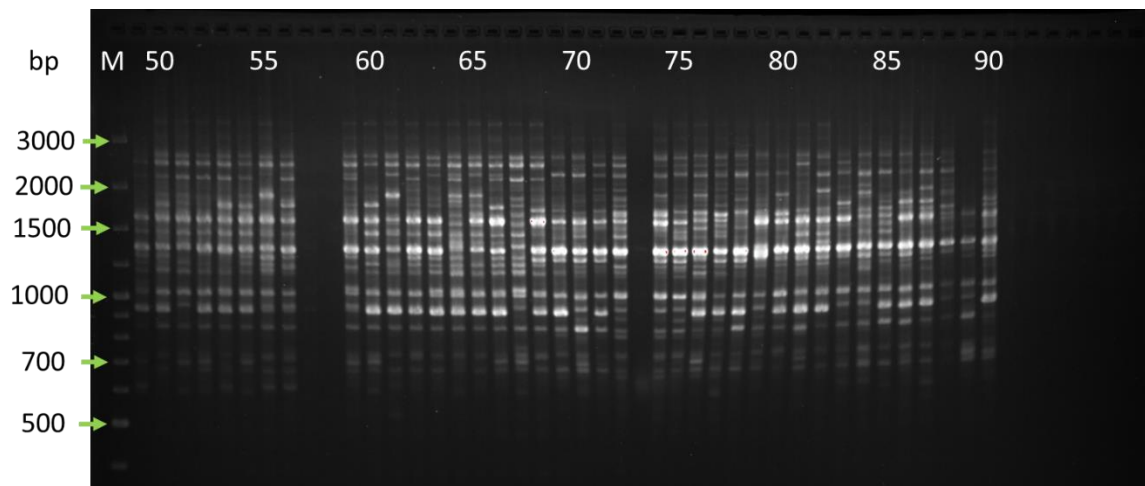


Figura 6: Amplificación del iniciador ISSR 826, en los genotipos (49-90)

#### 4.3 Parámetros para análisis de la diversidad genética

Los once iniciadores ISSR produjeron un total de 378 bandas integras y definidas. De este total, 375 (99,2 %) bandas son polimórficas y obteniendo un promedio de 34,1 bandas por iniciador. El valor PIC osciló entre 0,592 (ISSR 819) y 0,867 (ISSR 834) con un promedio de 0,774. El número efectivo de alelo promedio fue de 1,485 el cual vario de 1,608 a 1,427 que corresponde a los iniciadores ISS 812 y ISSR 840, respectivamente. De manera similar, la diversidad genética de Nei promedio fue de 0,294, el cual vario de 0,356 a 0,261, para los iniciadores ISSR 812 e ISSR



840, respectivamente. El índice informativo de Shannon promedio fue de 0,453 variando de 0,532 a 0,406, para los iniciadores ISSR 812 y ISSR 840, respectivamente (Tabla 4).

Tabla 4: Análisis de diversos parámetros de diversidad genética por iniciador

Iniciador	Total de bandas	Bandas polimórficas	Polimorfismo (%)	PIC	Ne	He	I
807	31	31	100	0,765	1,538	0,319	0,484
810	42	39	92.9	0,726	1,466	0,278	0,427
812	38	38	100	0,819	1,608	0,356	0,532
814	33	33	100	0,844	1,477	0,302	0,470
815	37	37	100	0,727	1,469	0,284	0,435
817	29	29	100	0,727	1,435	0,274	0,433
818	29	29	100	0,837	1,435	0,269	0,421
819	10	10	100	0,592	1,605	0,351	0,524
826	51	51	100	0,746	1,439	0,271	0,423
834	37	37	100	0,867	1,431	0,271	0,427
840	41	41	100	0,863	1,427	0,261	0,406
<b>Promedio</b>	<b>34,4</b>	<b>34,1</b>	<b>99,4</b>	<b>0,774</b>	<b>1,485</b>	<b>0,294</b>	<b>0,453</b>
<b>Total</b>	<b>378</b>	<b>375</b>					

PIC: Contenido de información polimórfica, Ne: Numero efectivo de alelos, He:

Diversidad genética de Nei, I: Índice informativo de Shannon

Del mismo modo se analizó los parámetros de diversidad genética por población, encontrando que el número efectivo de alelo promedio fue de 1,337, el cual vario de 1,411 a 1,213 que corresponde a las poblaciones Tamshiyacu y Nanay, respectivamente. De manera similar, la diversidad genética de Nei promedio fue de 0,2 el cual vario de 0,245 a 0,124 para las poblaciones Tamshiyacu y Nanay, respectivamente. El índice informativo de Shannon promedio fue de 0,302, variando de 0,374 a 0,183, para las poblaciones de Tamshiyacu y Nanay, respectivamente. Asi mismo, para comprender la diversidad genética de palo de rosa, se calculó la distancia genética, obteniendo en promedio total 0,554. Se encontró una distancia genética máxima de 0,835 entre los genotipos Mairiricay-11 y Santa Marta-4,

mientras que 0,092 fue la distancia genética mínima presente entre los genotipos Nanay-4 y Nanay-5 (Tabla 5).

Tabla 5: Análisis de diversos parámetros de diversidad genética por población

Población	Ne	He	I	DGj (máxima)	DGj (mínima)
Nanay	1,213	0,124	0,183		
Alpahuayo	1,296	0,172	0,255		
Zungarococha	1,223	0,127	0,184		
Tamshiyacu	1,411	0,245	0,374	0,835	0,092
Mairiricay	1,387	0,236	0,362	(Santamarta-4 / Mairiricay-11)	(Nanay-5 / Nanay-4)
Santa Marta	1,367	0,219	0,335		
Maria de Huajoya	1,396	0,236	0,356		
Huajoya	1,406	0,243	0,367		
<b>Promedio</b>	<b>1,337</b>	<b>0,200</b>	<b>0,302</b>		

Ne: Numero efectivo de alelos, He: Diversidad genética de Nei, I: Índice informativo de Shannon, DGj: Distancia genética de Jaccard

Para entender mejor los resultados de los parámetros de diversidad por población se calculó el flujo genético por población. Encontrándose que el flujo genético varió de 8,765 (Maria de Huajoya - Huajoya) a 0,883 (Nanay - Zungarococha) (Tabla 6).

Tabla 6: Flujo genético entre poblaciones de *Aniba rosaeodora* Ducke

Población	Nanay	Alpahuayo	Zungarococha	Tamshiyacu	Mairiricay	Santa Marta	Maria de Huajoya
<b>Alpahuayo</b>	1,477						
<b>Zungarococha</b>	0,883	1,625					
<b>Tamshiyacu</b>	2,032	4,481	2,480				
<b>Mairiricay</b>	2,153	3,588	1,940	5,473			
<b>Santa Marta</b>	1,520	2,161	1,160	3,179	2,973		
<b>Maria de Huajoya</b>	1,958	2,755	1,674	5,043	4,238	3,321	
<b>Huajoya</b>	2,352	3,451	1,758	5,416	5,595	3,853	8,765

#### 4.4 Análisis poblacional de la diversidad genética

Para explorar la estructura poblacional de los genotipos de palo de rosa, se implementó el modelo de agrupamiento bayesiano en el software STRUCTURE que dividió los genotipos de palo de rosa evaluadas en tres grupos; 29 genotipos (32,22% del total de muestras) en el grupo A, 41 genotipos (45,56% del total de muestras) en el grupo B y 20 genotipos (22,22% del total de muestras) en el grupo C (Figura 7). Así mismo, se identificó que los genotipos Mairiricay (13 y 15) y Tamshiyacu 3, respectivamente, presentan un mayor nivel de diversidad genética.

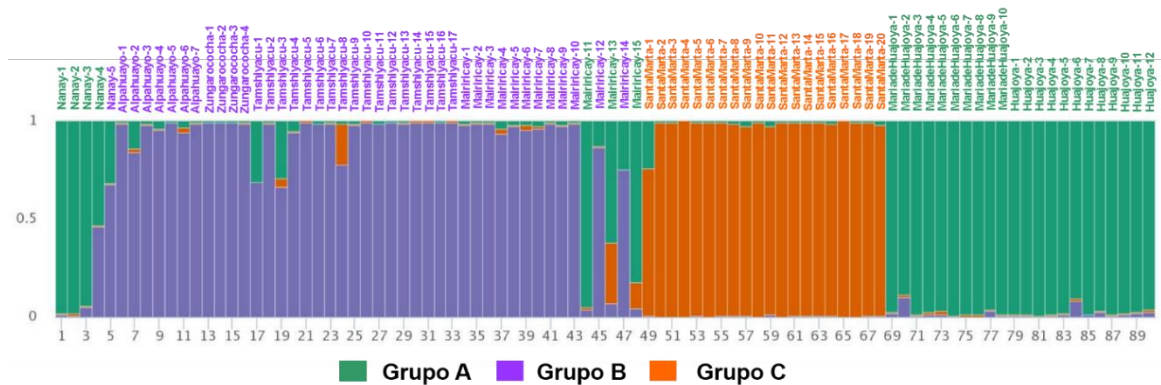


Figura 7: Agrupamiento basado en estructura de 90 genotipos de *Aniba rosaeodora* Ducke utilizando 11 iniciadores ISSR

Para evaluar más claramente el nivel de diversidad genética, se calcularon diversos índices de diversidad entre los grupos evaluados basadas en la estructura genética. El grupo A reflejó un mayor nivel de diversidad en comparación con los otros dos grupos, así lo demuestra el número efectivo de alelos (1,447), la diversidad genética de Nei (0,271), el índice de información de Shannon (0,416) y la distancia genética promedio (0,362). (Tabla 7).

Tabla 7: Diferentes parámetros de diversidad genética para tres grupos de *Aniba rosaeodora* Ducke

Población	Ne	He	I	DGj (promedio)	DGj (máxima)	DGj (mínima)
<b>A</b>	1,447	0,271	0,416	0,362	0,8597 (Mairiricay-11 / Nanay-1)	0,2146 (Nanay-4 / Nanay-3)
<b>B</b>	1,420	0,256	0,393	0,323	0,5277 (Mairiricay-14 / Mairiricay-8)	0,1001 (Alpahuayo-6 / Alpahuayo-1)
<b>C</b>	1,367	0,219	0,335	0,314	0,5504 (Santamarta-15 / Santamarta-9)	0,1449 (Santamarta-5 / Santamarta-2)

Ne: Numero Efectivo de Alelos, He: Diversidad Genética de Nei, I: Índice

Informativo de Shannon, DGj: Distancia genética de Jaccard

Para entender mejor los resultados de los parámetros de diversidad por población se calculó el flujo genético por grupo. Encontrándose que el flujo genético varía de 10,239 (Grupo A – B) a 3,7 (Grupo B - C) (Tabla 8).

Tabla 8: Flujo genético entre grupos poblacionales de *Aniba rosaeodora* Ducke

Población	A	B
<b>B</b>	10,239	
<b>C</b>	4,667	3,700

El análisis molecular de varianza (AMOVA) cuantificó la variación total en dos estratos: la variación dentro de las poblaciones (88%) y variación entre poblaciones (12%) (Tabla 9).

Tabla 9: El AMOVA revela una alta diferenciación dentro y entre poblaciones

Fuente	df	SS	MS	Est. Var.	%
Entre las poblaciones	2	594,539	297,270	8,220	<b>12%</b>
Dentro de las poblaciones	87	5290,461	60,810	60,810	<b>88%</b>
<b>Total</b>	89	5885,000		69,030	<b>100%</b>

La agrupación basada en Neighbor Joining dividieron los 90 genotipos de *Aniba rosaeodora* Ducke en tres grupos principales (A, B y C) similares a las identificadas mediante la estructura genética. El grupo A, unió las poblaciones de Huajoya, Maria de Huajoya, Nanay y los genotipos (Mairiricay (11, 13 y 15) y Tamshiyacu 5); el grupo B, unió solo a los genotipos de la población de Santa Marta; el grupo C, unió las poblaciones de Zungarococha, Alpahuayo, Tamshiyacu y Mairiricay (Figura 8).

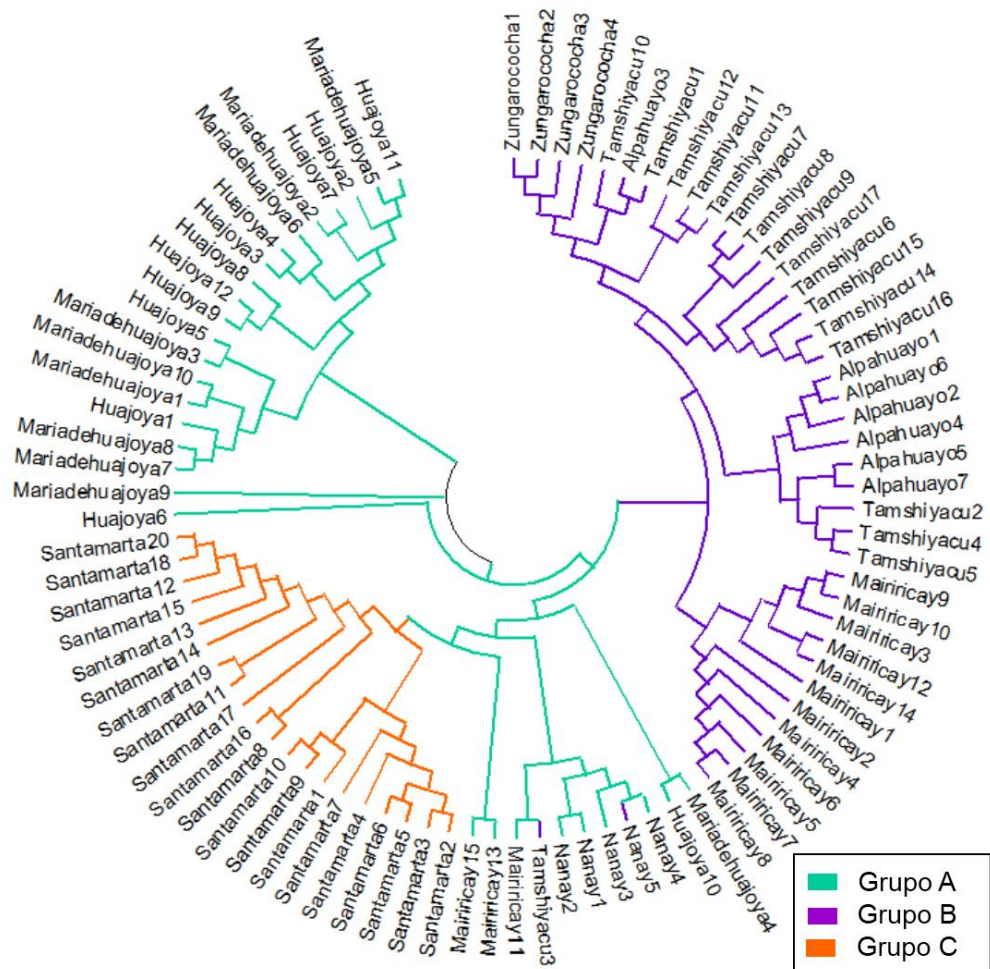


Figura 8: Neighbor Joining de 90 genotipos de *Aniba rosaeodora* Ducke

Para explorar la relación genética entre los grupos evaluados en la estructura genética, se realizó un agrupamiento basado en Neighbor Joining en su nivel de población que unió a los grupos A y B en un mismo clado, mientras que el grupo C se encontró genéticamente distinta del resto (Figura 9).

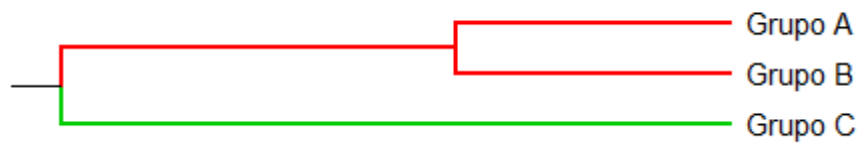


Figura 9: Neighbor Joining de los tres grupos genéticos formados

Para fortalecer nuestros resultados, se realizó la PCoA que claramente apoyó el agrupamiento de la estructura genética y el Neighbor Joining dividiendo los 90 genotipos de palo de rosa en tres grupos principales (A, B y C) (Figura 10).

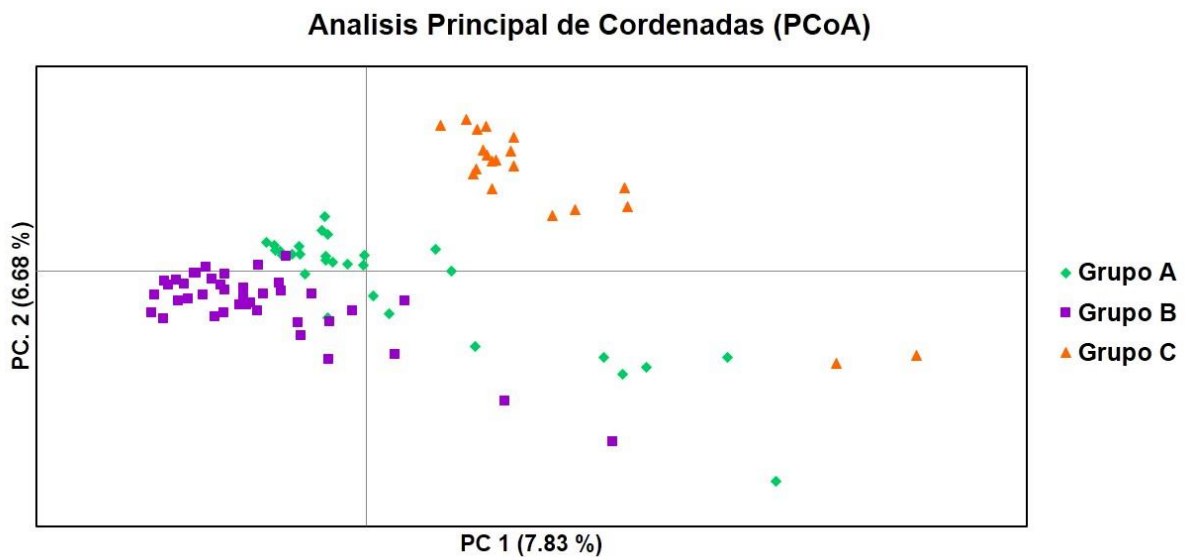


Figura 10: Análisis principal de coordenadas de *Aniba rosaeodora* Ducke

## V. DISCUSIÓN

### 5.1 Parámetros para análisis de la diversidad genética

Después de reconocer la importancia de la biodiversidad, la integridad, estabilidad y conservación de los ecosistemas y recursos genéticos se ha convertido en un tema candente de la investigación académica (Trombulak *et al.*, 2004, p. 1182). La disección del patrón de diversidad genética a nivel intra e inter poblacional es una necesidad fundamental para el desarrollo de actividades dirigidas a la conservación de los recursos genéticos forestales (Belletti *et al.*, 2017, p. 150). La presente investigación representa el primer intento de aclarar la genética diversidad y estructura de la población de palo de rosa a nivel de ADN utilizando marcadores ISSR. Se observó que las ISSR son abundantes y están ampliamente distribuidas en todo el genoma nuclear de la planta (González & Aguirre, 2007, p. 570). Los marcadores ISSR se han utilizado en gran medida para la identificación de huellas digitales y la investigación de la diversidad genética en plantas (Cardoso *et al.*, 2019, p. 2; Ekincialp, 2019, p. 2968). Un total de 11 marcadores ISSR altamente polimórficos se utilizaron en este estudio para llevar a cabo la diversidad genética y la estructura de la población en 90 genotipos de palo de rosa de 8 poblaciones en la Amazonía Peruana. Se registraron un total de 378 bandas con 34,4 bandas por iniciador, 375 (99,21%) de las 378 bandas fueron encontradas polimórficas. El número de bandas promedio por iniciador encontradas en este estudio fueron más altas que las de Angrizani *et al.*, (2013, p. 1), ya que informaron de 9,6 a 8,7 bandas por iniciador utilizando 11 SSR en 68 genotipos de palo de rosa.

Del mismo modo, el polimorfismo promedio encontrado en este estudio fue mayor que el de Santos *et al.*, (2008, p. 460), ya que informaron un 77,5% de polimorfismo utilizando RAPD en 94 genotipos de palo de rosa. El polimorfismo es uno de los

requisitos clave para determinar marcadores genéticos de buena calidad; por lo tanto, los marcadores ISSR satisfacen este requisito en palo de rosa. El PIC se encontró más alto (0,774) en este trabajo que en los hallazgos (Chen *et al.*, 2015, p. 2; Ebrahimi *et al.*, 2016, p. 1; Zhai *et al.*, 2010, p. 140; Zhu *et al.*, 2016, p. 1245), todos los cuales utilizaron marcadores de SSR para evaluar la diversidad genética en la familia Lauraceae. Estos resultados sugieren que se pueden identificar loci más diversos con marcadores ISSR y, por lo tanto, se pueden usar de manera efectiva como una herramienta para evaluar la diversidad genética y otras investigaciones que se basan en variantes genéticas. El número máximo de alelos efectivos es deseable porque representa la presencia de un mayor nivel de variaciones genéticas. El número de alelos efectivos (1,427 a 1,608) encontrados en este trabajo fue mayor en el rango (1,273 a 1,412) al de Meng *et al.*, (2014, p. 390) utilizando marcadores de AFLP para evaluar la diversidad genética en *Aconitum kongboense* L. De manera similar, Costa *et al.*, (2015, p. 18409) obtuvieron un rango menor de número de alelos efectivos (1,22 a 1,39) que este estudio utilizando marcadores RAPD. Se podría observar un mayor número de alelos efectivos en este estudio debido a las diferencias de los materiales experimentales utilizados o debido a diferentes sistemas de marcadores moleculares. El índice de información de Shannon generalmente distingue el nivel de diversidad genética disponible en una población, combinando abundancia y uniformidad. Dev *et al.*, (2010, p. 269) informaron un rango más bajo del índice de información de Shannon (0,1895) que este estudio con marcadores ISSR, destacando los genotipos de palo de rosa evaluadas en este trabajo más diversas, con variantes genéticas distribuidas de manera más uniforme en todos los genotipos. La diversidad de genes obtenida en este estudio fue mucho mayor en



comparación con lo informado por los estudios anteriores (Gibson & Wheelwright, 1995, p. 51; Wang *et al.*, 2004, p. 307).

## **5.2 Análisis poblacional de la diversidad genética**

Según Spielman *et al.*, (2004, p. 441), las especies en peligro de extinción albergan un bajo nivel de diversidad genética, principalmente debido a la deriva genética y endogamia. Sin embargo, especulamos los siguientes factores responsables de la mayor diversidad genética de palo de rosa en la Amazonia Peruana. En primer lugar, un mayor flujo de genes entre la población puede ser una de las razones principales detrás del mayor nivel de diversidad genética. En segundo lugar, la heterogeneidad ambiental y la topografía compleja de nuestra Amazonia Peruana proporcionaron un hábitat óptimo para el palo de rosa durante el cambio climático en el pasado y desempeñaron un papel importante en la conservación de su diversidad genética a un nivel mayor. Para comprender el nivel de variaciones genéticas del palo de rosa, se calcularon diversos índices de diversidad entre las poblaciones. El grupo A se encontró más diversa en comparación con otras al contener un mayor número de alelos efectivos, índice de información de Shannon y diversidad genética de Nei. Los resultados de estos índices de diversidad fueron mucho mayores que los informados por estudios anteriores (Meng *et al.*, 2014, p. 390; Dev *et al.*, 2010, p. 269; Wang *et al.*, 2004, p. 307). En este estudio se encontró una distancia genética máxima de 0,835 entre los genotipos Santa Marta-4 y Mairiricay-11, mientras que 0,092 fue la distancia genética mínima presente entre los genotipos Nanay-5 y Nanay-4. Entre los grupos obtenidos, el grupo A reflejó una mayor distancia genética y fue seguida por el grupo B y C, respectivamente. Mairiricay-11 y Nanay-1 eran los dos genotipos más distantes de la población A, mientras que Mairiricay-14 y Mairiricay-8 eran los dos genotipos genéticamente

más distantes del grupo B. Santamarta-15 y Santamarta-9 eran dos genotipos más distintos del grupo C. Según Arystanbekkyzy *et al.*, (2018, p. 5), la evaluación de plantas con rasgos de interés siempre fue el foco principal de los reproductores y los genotipos distintos en su diseño genético siempre mantuvieron su lugar como fuente de variación. Por lo tanto, se puede sugerir que estos genotipos son genéticamente distintos y pueden actuar como una gran fuente de variaciones para los programas de reproducción y conservación del palo de rosa en la Amazonia Peruana.

AMOVA mostró que la mayoría de las variaciones genéticas fueron explicadas por los individuos dentro de las poblaciones. Encontramos AMOVA con una baja diversidad entre las poblaciones (12%) y alta dentro de las poblaciones (88%). Estos hallazgos son similares a los de Santos *et al.*, (2008, p. 460), ya que informaron variaciones dentro y entre las poblaciones con valores de 98,14 y 1,86%, respectivamente, utilizando marcadores RAPD para evaluar 94 genotipos de palo de rosa en la Amazonia Brasileña. Asimismo, estos resultados permiten responder a la tala selectiva de palo de rosa en la cuenca del Amazonas, donde se eliminaron muchas poblaciones intermedias y algunas poblaciones quedaron completamente aisladas, debido a que la diversidad entre las poblaciones es muy baja.

El algoritmo de estructura genética basado en modelos dividió los genotipos de palo de rosa en 3 grupos principales (A, B, C) en función de sus puntos de recolección (Figura 7). El grupo A fue genéticamente el grupo más diverso, ya que comprende un total de 29 genotipos de los puntos de recolección de Nanay, Maria de Huajoya, Mairiricay y Huajoya. El grupo B tuvo la mayor cantidad de individuos uniendo un total de 41 genotipos de Alpahuayo, Zungarococha, Tamshiyacu y Mairiricay. El

grupo C se encontró menos diversa al unir los 20 genotipos de la localidad de Santa Marta. Observando la Figura 1, está claro que Santa Marta está geográficamente más apartada del resto de poblaciones, por lo tanto, posiblemente muy poco flujo de genes de otra población interactúe con esta población, este aislamiento lleva a conservar la arquitectura genética de esta población y la diferencia de otras. Para fortalecer esta hipótesis, se calculó el flujo de genes que reveló la presencia de un flujo genético mínimo en el grupo C. Los genotipos de Nanay, Maria de Huajoya, Mairiricay y Huajoya formaron el grupo A y los genotipos pertenecientes a esta se agruparon, lo que refleja su similitud genética dentro y entre las poblaciones. La Figura 1 reflejó que los genotipos de los puntos de recolección del grupo A se encontraban más cerca y se suponía que su agrupamiento era su flujo genético más alto. De manera similar, el grupo A alberga una mayor diversidad genética en comparación con el resto de poblaciones supuestamente debido al mayor flujo de genes en esta población. Según Slatkin (1994, p. 8), el flujo de genes entre las poblaciones conserva la diversidad genética. Y el flujo genético frecuente da como resultado un aumento de la diversidad genética (Fu *et al.*, 2016, p. 2). Los genotipos de Zungarococha, Alpahuayo, Mairiricay y Tamshiyacu reflejaron su similitud genética al formar el grupo B. Este grupo reflejó una mayor diversidad genética que el grupo C debido a un mayor flujo de genes debido a un punto de recolección más cercano. Según los informes de campo, se reporta que las plantaciones de Zungarococha, Alpahuayo y Mairiricay se propagaron a partir de semillas botánicas provenientes de las poblaciones naturales de Tamshiyacu.

La agrupación Neighbor Joining se realizó para comprender la relación genética de 90 genotipos de palo de rosa, que apoyaron el agrupamiento de la estructura y agruparon los genotipos en tres grupos principales A, B y C (Figura 8). El análisis

del Neighbor Joining también reflejó al grupo A como el grupo más diverso porque los genotipos de cada población se encontraron cerca de los genotipos de las otras poblaciones. Similar a la estructura, los genotipos de los grupos B y C se unieron en sus respectivas poblaciones en sus puntos de recolección. Las discrepancias mostradas en la agrupación del Neighbor Joining se pueden describir por su poder de resolución reducido en relación con la estructura basada en modelos (Newell, 2013, p. 30). Para comprender la relación genética entre la estructura de los grupos evaluados de manera más amplia, se realizó el agrupamiento Neighbor Joining en el nivel de inter población. El Neighbor Joining unió a los 3 grupos en dos grupos, el grupo A y B se encontraron en el mismo clado y reflejaron similitud entre sí. La población C se agrupó por separado y reflejó su disimilitud genética con respecto a las otras dos poblaciones, y estos resultados también apoyaron el agrupamiento del algoritmo de estructura, donde la población C hizo clara la divergencia de otras dos poblaciones.

También se realizó el análisis de coordenadas principales (PCoA) que apoyó el agrupamiento de la estructura y el análisis del Neighbor Joining (Figura 10). Al igual que en el análisis del Neighbor Joining a nivel inter poblacional, el grupo A y B se encontraron cerca una de la otra, mientras que el grupo C hizo una clara divergencia. PCoA explica claramente el grupo A como la población más diversa debido a un mayor flujo de genes. La aparición de algunas diferencias de luz entre la estructura genética y la PCoA puede derivar de su diferente resolución de agrupamiento, con una mayor resolución revelada por el análisis de la estructura genética (Ali, *et al.*, 2019, p. 17).

### **5.3 Implicaciones para la conservación del palo de rosa en la Amazonia Peruana**

La información sobre la diversidad genética y la estructura de la población del palo de rosa en la Amazonia Peruana puede proporcionar una base para la implementación de diversas actividades relacionadas con la conservación y la utilización de los recursos de palo de rosa en un futuro próximo. El conocimiento evaluado a partir de estudios de caracterización de la diversidad genética es muy importante para dilucidar el mecanismo de peligro e investigar las alternativas para la conservación de especies en peligro (Vicenti *et al.*, 2013, p. 2). Este estudio explicó ampliamente que el palo de rosa todavía alberga un alto nivel de diversidad genética, aunque los bosques se han fragmentado gravemente y esta planta se encuentra en peligro de extinción en Perú y Brasil debido a la sobreexplotación de la industria de la perfumería. Afortunadamente, todavía tenemos la oportunidad de conservar y utilizar los recursos genéticos de palo de rosa restantes de manera más eficiente y razonable. Por lo tanto, es crucial realizar conservaciones in situ de poblaciones naturales de palo de rosa que reflejen un gran nivel de diversidad genética, en particular, las poblaciones de palo de rosa de la Amazonia Peruana deben tener prioridad para las diversas actividades de conservación, ya que reflejaron un nivel más alto de diversidad genética en este estudio. Sobre la base de los resultados de este estudio, sugerimos la conservación en la Amazonía Peruana en tres niveles por separado. El grupo A fue el más diverso, mientras que el grupo C fue bastante diferente del resto de la población y reflejó un menor nivel de flujo genético y diversidad genética. La baja diversidad genética puede deberse al cuello de botella genético (Avise, 2000, p. 100), y tales poblaciones siempre están bajo presión y en peligro de extinción. Por lo tanto, es necesario tomar iniciativas

firmes al iniciar las actividades *in situ* para que estas poblaciones de palo de rosa de la Amazonia Peruana conserven su hábitat. El palo de rosa tiene una baja germinación de semillas y tasa de producción de frutos, por lo tanto, el trasplante o la propagación parecen muy difícil o casi imposible. Para lidiar con esto, se deben hacer algunos esfuerzos *ex situ* recolectando semillas de diferentes lugares para realizar su propagación en los viveros, lo que puede ser útil para mejorar la germinación y la supervivencia de las plántulas de manera más significativa. Además, sería mejor realizar varias actividades de cultivo controlado y cultivo de tejidos vegetales si se conserva más germoplasma para disminuir el riesgo de amenaza / peligro.

## VI. CONCLUSIONES

- El protocolo para aislamiento de ADN de *Aniba rosaeodora* Ducke fue óptimo, observándose en la prueba electroforética un ADN íntegro y bien definido y la prueba espectrofotométrica indica un ADN libre de contaminantes obteniéndose ratios de absorbancia promedio de  $A_{260/280}$  ( $2,10 \pm 0,18$ ) y  $A_{260/230}$  ( $2,09 \pm 0,13$ ) y una concentración promedio de  $246,5 \pm 84,1$  ng/ $\mu$ l.
- El número efectivo de alelos ( $N_e$ ), la diversidad genética de Nei ( $H_e$ ) y el índice informativo de Shannon ( $I$ ), indican que la población de Tamshiyacu y Huajoya presentan mayor diversidad genética. Esta diversidad queda también reflejada en los altos valores de flujo genético para estas dos poblaciones, donde se los valores son 8,765 (Huajoya – Maria de Huajoya) y 5,473 (Tamshiyacu - Mairiricay).
- La estructura genética formo 3 grupos principales (A, B y C) y se identificaron 3 genotipos con mayor diversidad genética (Mairiricay (13 y 15) y Tamshiyacu 3), estos genotipos son importantes para futuros planes de manejo y conservación de la especie.
- Los parámetros de diversidad y flujo genético revelan que el grupo A (Huajoya, Maria de Huajoya y Nanay) presenta la mayor diversidad genética.
- El AMOVA revelo una baja diversidad entre poblaciones (12 %) y alta dentro de las poblaciones (88 %).

## VII. RECOMENDACIONES

- Tomar como referencia los resultados obtenidos de esta investigación para planificar y diseñar estrategias de manejo y conservación de *Aniba rosaeodora* Ducke en la Amazonía Peruana.
- Generar una data base con fines de investigación, donde estén reportados todos los individuos de *Aniba rosaeodora* Ducke en la Amazonía Peruana, esta facilitara las futuras investigaciones (Básicas o Aplicadas) de la especie en nuestra Amazonia Peruana.



## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADRIANZEN JULCA PEDRO MARCELINO. (2007). Análisis de la diversidad genética de ocas cultivadas *Oxalis tuberosa* Mol. de cuatro comunidades del cuzco usando marcadores moleculares AFLP. [Lima]: Universidad Nacional Agraria La Molina; p. 1-97.
- ANGRIZANI, R. C., CONTIM, L. A., & LEMES, M. R. (2013). Development and characterization of microsatellite markers for the endangered Amazonian tree *Aniba rosaeodora* (Lauraceae). *Applications in plant sciences*, 1(9), 1-3.
- ALI, F., YILMAZ, A., NADEEM, M. A., HABYARIMANA, E., SUBAŞI, I., NAWAZ, M. A., & CHUNG, G. (2019). Mobile genomic element diversity in world collection of safflower (*Carthamus tinctorius* L.) panel using iPBS-retrotransposon markers. *PloS one*, 14(2), 1-19.
- AMUSANT, N., BEAUCHÈNE, J., DIGEON, A., & CHAIX, G. (2016). Essential oil yield in rosewood (*Aniba rosaeodora* Ducke): initial application of rapid prediction by near infrared spectroscopy based on wood spectra. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, 24(6), 507-515.
- ARYSTANBEKKYZY, M., NADEEM, M. A., AKTAS, H., YEKEN, M. Z., ZENCIRCI, N., NAWAZ, M. A., & BALOCH, F. S. (2018). Phylogenetic and taxonomic relationship of turkish wild and cultivated emmer (*Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*) revealed by iPBSretrotransposons markers. *Int J Agric Biol*, In Press. 00(0), 1-12.
- AVISE, J., C. 2000. *Phylogeography: The History and Formation of Species*. Harvard University Press; p. 1-466.

- BALOCH, F. S., DERYA, M., ANDEDEN, E. E., ALSALEH, A., CÖMERTPAY, G., KILIAN, B., & ÖZKAN, H. (2015). Inter-primer binding site retrotransposon and inter-simple sequence repeat diversity among wild *Lens* species. *Biochemical systematics and ecology*, 58, 162-168.
- BECERRA, V., & PAREDES, C. (2000). Use of biochemical and molecular markers in genetic diversity studies. *Agricultura Técnica*, 60(3), 270-281.
- BELLETTI, P., FERRAZZINI, D., DUCCI, F., DE ROGATIS, A., & MUCCIARELLI, M. (2017). Genetic diversity of Italian populations of *Abies alba*. *Dendrobiology*, 77, 147-159.
- BERMÚDEZ, M. D. J., GUZMÁN, S., OROZCO, M., VELÁZQUEZ, J. J., BUENROSTRO, M. T., & MICHEL, C. Y. (2016). Optimización de un protocolo para aislamiento de DNA de hojas de *Saccharum officinarum*. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 7(4), 897-910.
- BORNET, B., & BRANCHARD, M. (2001). Nonanchored inter simple sequence repeat (ISSR) markers: reproducible and specific tools for genome fingerprinting. *Plant molecular biology reporter*, 19(3), 209-215.
- BOZCHALOYI, S. E., SHEIDAI, M., KESHAVARZI, M., NOORMOHAMMADI, Z., HASSANZADEH, M., GHASEMZADEH-BARAKI, S., & KOOHDAR, F. (2017). Analysis of genetic diversity in *Geranium robertianum* by ISSR markers. *Phytologia Balcanica: International Journal of Balkan Flora and Vegetation*, 23(2), 157-166.
- BRULEAUX, A. M. (1989). Deux productions passées de la forêt guyanaise. L'essence de bois de rose et la gomme de balata. *Bois & Forêts Des Tropiques*, 219(219), 99-113.

- CASTRO, J. C., RODRÍGUEZ, H. N., MADDOX, J. D., JIU, B., PETTERMAN, J. B., MARAPARA, J. L., & COBOS, M. (2017). A Simple and efficient method for high-quality total RNA isolation from Oleaginous microalgae. *Plant Cell Biotechnology and Molecular Biology*, 18(1-2), 15-21.
- CASTRO, D., RODRÍGUEZ, Á. M., CHOTA, W., DEL CASTILLO, D., SOTERO, V. E., MEJÍA, K. M., & GARCÍA, C. R. (2010). Variabilidad Genética de la Shapaja *Attalea Moorei* en seis Poblaciones Naturales de la Amazonía Peruana. *Folia Amazónica*, 19(1-2), 41-48.
- CARDOSO, M. N., NASCIMENTO, A. L. S., DE OLIVEIRA, L. A. R., DE ASSUNÇÃO, D. A., MACHADO, C. A., DE OLIVEIRA, A. C. A., & MUNIZ, A. D. S. (2019). Genetic diversity in native *Genipa americana* (Rubiaceae) populations in Sergipe, Brazil. *Genet. Mol. Res.* 18(1), 1-10.
- CHEN, C. C., XU, Y., XU, T., STATON, M., STOTT, G., BUKLES, O., & LIANG, H. (2015). Diversity level of genomic microsatellites in redbay (*Persea borbonia* L.) generated by Illumina sequencing. *journal of Plant Science and Molecular Breeding*, 4(1), 1-5.
- CHIA WONG JULIO ALFONSO. (2009). Caracterización molecular mediante marcadores ISSR de una colección de 50 árboles clonales e híbridos de cacao (*Theobroma cacao* L.) de la UNAS-Tingo María. p. 1-118.
- COELHO, L. M., LOPES, M. T. G., CHAGAS, E. A., PIO, R., PASQUAL, M., NETO, C., & MAGALHÃES, M. A. (2017). Genetic diversity in populations of Brazil nut. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 17(4), 382-389.
- CONTIM, L. A. S., CARVALHO, C. R. D., MARTINS, F. A., & FREITAS, D. V. D. (2005). Nuclear DNA content and karyotype of Rosewood (*Aniba rosaeodora*). *Genetics and Molecular Biology*, 28(4), 754-757.

- COSTA, L. S., REINIGER, L. R. S., HEINZMANN, B. M., AMARAL, L. P., & SERROTE, C. M. (2015). Study of the genetic diversity and structure of a natural population of *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez. using RAPD markers. *Genet. Mol. Res*, *14*, 18407-18413.
- DELLAPORTA, S. L., WOOD, J., & HICKS, J. B. (1983). A plant DNA minipreparation: version II. *Plant molecular biology reporter*, *1*(4), 19-21.
- DEV, S. A., SHENOY, M., & BORGES, R. M. (2010). Genetic and clonal diversity of the endemic ant-plant *Humboldtia brunonis* (Fabaceae) in the Western Ghats of India. *Journal of biosciences*, *35*(2), 267-279.
- DIAS, A. C. C., SERRA, A. C., SAMPAIO, D. S., BORBA, E. L., BONETTI, A. M., & OLIVEIRA, P. E. (2018). Unexpectedly high genetic diversity and divergence among populations of the apomictic Neotropical tree *Miconia albicans*. *Plant Biology*, *20*(2), 244-251.
- DOYLE, J. (1991). DNA protocols for plants. In *Molecular techniques in taxonomy*. p. 283-293.
- EBRAHIMI, A., ZAREI, A., LAWSON, S., WOESTE, K. E., & SMULDERS, M. J. M. (2016). Genetic diversity and genetic structure of Persian walnut (*Juglans regia*) accessions from 14 European, African, and Asian countries using SSR markers. *Tree genetics & genomes*, *12*(6), 1-12.
- EKINCIALP A. 2019. The Differences Among Melon Genotypes And Varieties Under Salt Stress Based On Certain Morphological And Physiological Properties—Mixture Modeling And Principal Component Analysis (PCA). *Appl Ecol Environ Res*. *17*(2), 2965–2981.

- EVANNO, G., REGNAUT, S., & GOUDET, J. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular ecology*, 14(8), 2611-2620.
- EXCOFFIER, L., SMOUSE, P. E., & QUATTRO, J. M. (1992). Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131(2), 479-491.
- FU, P. C., GAO, Q. B., ZHANG, F. Q., XING, R., WANG, J. L., LIU, H. R., & CHEN, S. L. (2016). Gene flow results in high genetic similarity between *Sibiraea* (Rosaceae) species in the Qinghai-Tibetan Plateau. *Frontiers in plant science*, 7(1596), 1-10.
- GENTRY, A. H. (1992). Tropical forest biodiversity: distributional patterns and their conservational significance. *Oikos*, 63(1), 19-28.
- GIBSON, J. P., & WHEELWRIGHT, N. T. (1995). Genetic structure in a population of a tropical tree *Ocotea tenera* (Lauraceae): influence of avian seed dispersal. *Oecologia*, 103(1), 49-54.
- GOETTSCH, B., HILTON, C., CRUZ, G., DUFFY, J. P., FRANCES, A., HERNÁNDEZ, H. M., & TAYLOR, N. P. (2015). High proportion of cactus species threatened with extinction. *Nature plants*, 1(10), 1-7.
- GONZÁLEZ ANDREA & AGUIRRE XITLALI. 2007. Inter Simple Sequence Repeats (ISSRs). *Ecología molecular*. 19, 567-571.
- HABYARIMANA, E. (2016). Genomic prediction for yield improvement and safeguarding of genetic diversity in CIMMYT spring wheat ('Triticum aestivum'L.). *Australian Journal of Crop Science*, 10(1), 127-136.
- HARIRI, M. R., CHIKMAWATI, T., & HARTANA, A. (2017). Genetic diversity of *Indigofera tinctoria* L. in java and madura islands as natural batik dye based

- on inter-simple sequence repeat markers. *Journal of Mathematical and Fundamental Sciences*, 49(2), 105-115.
- HOU, Y., & LOU, A. (2011). Population genetic diversity and structure of a naturally isolated plant species, *Rhodiola dumulosa* (Crassulaceae). *PLoS One*, 6(9), 1-10.
- IBRAHIM, M. A., NA, M., OH, J., SCHINAZI, R. F., MCBRAYER, T. R., WHITAKER, T., & HAMANN, M. T. (2013). Significance of endangered and threatened plant natural products in the control of human disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(42), 16832-16837.
- JACCARD, P. (1908). Nouvelles recherches sur la distribution florale. *Bull. Soc. Vaud. Sci. Nat.*, 44, 223-270.
- KASTURE, A., KRISHNAMURTHY, R., & RAJKUMAR, K. (2016). Genetic variation in the endangered Indian sweet flag (*Acorus calamus* L.) estimated using ISSR and RAPD markers. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 3(3), 112-119.
- KRAINOVIC, P., ALMEIDA, D., & SAMPAIO, P. (2017). New allometric equations to support sustainable plantation management of rosewood (*Aniba rosaeodora* Ducke) in the Central Amazon. *Forests*, 8(9), 1-28.
- LAIKRE, L. (2010). Genetic diversity is overlooked in international conservation policy implementation. *Conservation Genetics*, 11(2), 349-354.
- MAIA, J. G. S., & MOURÃO, R. H. V. (2016). Amazon Rosewood (*Aniba rosaeodora* Ducke) Oils. In *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety*, p. 193-201.

- MAY, P. H., & BARATA, L. E. (2004). Rosewood exploitation in the Brazilian Amazon: options for sustainable production. *Economic Botany*, 58(2), 257-265.
- MENG, F., PENG, M., WANG, R., WANG, C., & GUAN, F. (2014). Analysis of genetic diversity in *Aconitum kongboense* L. revealed by AFLP markers. *Biochemical systematics and ecology*, 57, 388-394.
- MITTERMEIER, R. A., TURNER, W. R., LARSEN, F. W., BROOKS, T. M., & GASCON, C. (2011). Global biodiversity conservation: the critical role of hotspots. In *Biodiversity hotspots*, p. 3 - 22.
- MOHEBODINI M, KHALILI-BASERI I, BEHNAMIAN M, DEZHSETAN S. (2017). Assessment of genetic diversity of Iranian purslane (*Portulaca oleracea* L.) accessions using ISSR makers. *World Acad Sci Eng Technol Int J Agric Biosyst Eng*. 4(7), 98-105.
- MULLIS, K. B. (1990). The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American*, 262(4), 56-65.
- NEWELL C. 2013. Applications of Queueing Theory. Springer Science & Business Media; p. 1-314.
- NG, W. L., & TAN, S. G. (2015). Inter-simple sequence repeat (ISSR) markers: are we doing it right. *ASM Sci J*, 9(1), 30-39.
- PÉREZ, I., ANGULO, L., OSORIO, G., RAMIS, C., BEDOYA, Á. M., FIGUEROA, R., & INFANTE, D. (2011). Método modificado de obtención de adn genómico en orquídeas (*Cattleya* spp.): Para amplificación con marcadores moleculares. *Bioagro*, 23(1), 27-34.
- PIÑERO, D., CABALLERO, J., CABRERA, D., CANTEROS, C. E., CASAS, A., SORTIBRÁN, A. C., & DELGADO, P. (2008). La diversidad genética como

- instrumento para la conservación y el aprovechamiento de la biodiversidad: estudios en especies mexicanas. *Capital natural de México*, 1, 437-494.
- SAITOU, N., & NEI, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular biology and evolution*, 4(4), 406-425.
- SAIRKAR, P., CHOUHAN, S., BATAV, N., & SHARMA, R. (2013). Optimization of DNA isolation process and enhancement of RAPD PCR for low quality genomic DNA of *Terminalia arjuna*. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 11(1), 17-24.
- SANTOS, R. P., QUISEN, R. C., OLIVEIRA, C. L., DA SILVA ANGELO, P. C., SAMPAIO, P. DE T. B. (2007). RAPD em Pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke): adaptação do método para coleta de amostras in situ, ajuste das condições de PCR e apresentação de um processo para selecionar bandas reprodutíveis. 37(2), 253-260.
- SANTOS, R. P., ÂNGELO, P. C. D. S., SAMPAIO, P. D. T. B., QUISEN, R. C., LEITE, Â. M. C., & OLIVEIRA, C. L. D. (2008). Geographic pattern of genetic diversity in natural populations of Rosewood (*Aniba rosaeodora*), in the Central Amazonia. *Acta Amazonica*, 38(3), 459-466.
- SLATKIN M. (1994). Gene flow and population structure. *Ecol Genet.* 3, 1-17.
- SPIELMAN, D., BROOK, B. W., BRISCOE, D. A., & FRANKHAM, R. (2004). Does inbreeding and loss of genetic diversity decrease disease resistance?. *Conservation Genetics*, 5(4), 439-448.
- SPOONER, D. VAN TREUREN, R., DE VICENTE M. C. (2005). Molecular markers for genebank management. *Bioversity International*, p. 1-127.



- TABIN, S., KAMILI, A. N., GANIE, S. A., ZARGAR, O., SHARMA, V., & GUPTA, R. C. (2016). Genetic diversity and population structure of *Rheum* species in Kashmir Himalaya based on ISSR markers. *Flora*, 223, 121-128.
- TAMAY DE DIOS, L., IBARRA, C., & VELASQUILLO, C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en discapacidad*, 2(2), 70-78.
- TROMBULAK, S. C., OMLAND, K. S., ROBINSON, J. A., LUSK, J. J., FLEISCHNER, T. L., BROWN, G., & DOMROESE, M. (2004). Principles of conservation biology: Recommended guidelines for conservation literacy from the education committee of the society for conservation biology. *Conservation biology*, 18(5), 1180-1190.
- VINCETI, B., LOO, J., GAISBERGER, H., VAN ZONNEVELD, M. J., SCHUELER, S., KONRAD, H., & GEBUREK, T. (2013). Conservation priorities for *Prunus africana* defined with the aid of spatial analysis of genetic data and climatic variables. *PloS one*, 8(3), 1-16.
- WANG, Z. S., AN, S. Q., LIU, H., LENG, X., ZHENG, J. W., & LIU, Y. H. (2004). Genetic structure of the endangered plant *Neolitsea sericea* (Lauraceae) from the Zhoushan Archipelago using RAPD markers. *Annals of Botany*, 95(2), 305-313.
- YALDIZ, G., CAMLICA, M., NADEEM, M. A., NAWAZ, M. A., & BALOCH, F. S. (2018). Genetic diversity assessment in *Nicotiana tabacum* L. with iPBS-retrotransposons. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 42(3), 154-164.
- ZHAI, S. N., YAN, X. L., NAKAMURA, K., MISHIMA, M., & QIU, Y. X. (2010). Isolation of compound microsatellite markers for the endangered plant

*Neolitsea sericea* (Lauraceae). *American journal of botany*, 97(12), 139-141.

ZHANG, L., WANG, B., PAN, L., & PENG, J. (2013). Recycling isolation of plant DNA, a novel method. *Journal of Genetics and Genomics*, 40(1), 45-54.

ZHU, S., DING, Y., YAP, Z., & QIU, Y. (2016). De novo assembly and characterization of the floral transcriptome of an economically important tree species, *Lindera glauca* (Lauraceae), including the development of EST-SSR markers for population genetics. *Molecular biology reports*, 43(11), 1243-1250.

ZIETKIEWICZ, E., RAFALSKI, A., & LABUDA, D. (1994). Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, 20(2), 176-183.

## **IX. ANEXO**

## Anexo 1: Autorización de colecta de *Aniba rosaeodora* Ducke



### RESOLUCIÓN DE DIRECCIÓN GENERAL N° 162 -2018-MINAGRI-SERFOR-DGGSPFFS

Lima, 09 MAYO 2018

#### VISTOS:

La solicitud de autorización con fines de investigación científica de flora, con colecta y con estudios moleculares, fuera de Áreas Naturales Protegidas, registrada mediante CUT N° 00020524-2018 el 02 de abril de 2018 (fs. 01), presentada por el señor Stalin Vasquez Guizado, en adelante el administrado y el Informe Técnico N° 0263-2018-MINAGRI-SERFOR/DGGSPFFS-DGSPF de fecha 02 de mayo de 2018 (fs. 11), y;

#### CONSIDERANDO:

Que, el artículo 66° de la Constitución Política del Perú de 1993, establece que los recursos naturales, renovables y no renovables, son patrimonio de la Nación. El Estado es soberano en su aprovechamiento;

Que, el artículo 13° de la Ley N° 29763, crea el Servicio Nacional Forestal y de Fauna Silvestre-SERFOR, como organismo público técnico especializado, con personería jurídica de derecho público interno, como pliego presupuestal adscrito al Ministerio de Agricultura y Riego. Asimismo, se señala que el SERFOR es la autoridad nacional forestal y de fauna silvestre, ente rector del Sistema Nacional de Gestión Forestal y de Fauna Silvestre (SINAFOR), y se constituye en su autoridad técnico-normativa a nivel nacional, encargada de dictar las normas y establecer los procedimientos relacionados a su ámbito;

Que, el artículo 9° de la Ley N° 26821, Ley Orgánica para el aprovechamiento sostenible de los Recursos Naturales, señala que el Estado promueve la investigación científica y tecnológica sobre la diversidad, calidad, composición, potencialidad y gestión de los recursos naturales. Promueve, asimismo, la información y el conocimiento de los recursos naturales. Para estos efectos, podrán otorgarse permisos para investigación en materia de recursos naturales;



Que, el artículo 140° de la Ley N° 29763, Ley Forestal y de Fauna Silvestre, señala que la colecta o extracción de recursos forestales y de fauna silvestre con fines de investigación orientada a determinación de genotipo, filogenia, sistemática y biogeografía es autorizada siguiendo procedimientos simplificados establecidos por el SERFOR. Los requisitos y procedimientos para la colecta o extracción y la exportación de especímenes de flora y fauna silvestre con fines de investigación lo establece el reglamento de la citada Ley;

Que, el Protocolo de Nagoya sobre Acceso a los Recursos Genéticos y Participación Justa y Equitativa en los Beneficios que se Deriven de su Utilización al Convenio sobre la Diversidad Biológica (Protocolo de Nagoya), el cual fue firmado por el Perú el 04 de mayo de 2011, aprobado mediante Resolución Legislativa N° 30217 del 03 de julio de 2014 y ratificado mediante Decreto Supremo N° 029-2014-RE, el 04 de julio de 2014, reconoce la importante contribución de la transferencia de tecnología y la cooperación al desarrollo sostenible, para crear capacidad de investigación e innovación que añada valor a los recursos genéticos en

los países en desarrollo, conforme a los artículos 16° y 19° del Convenio de Diversidad Biológica;

Que, el literal a) del artículo 8° del Protocolo de Nagoya indica respecto a la elaboración y aplicación de la legislación o requisitos reglamentarios sobre acceso y participación en los beneficios de cada país cada Parte, que se deben crear condiciones para promover y alentar la investigación que contribuya a la conservación y utilización sostenible de la diversidad biológica, particularmente en los países en desarrollo, incluyendo medidas simplificadas de acceso para fines de investigación de índole no comercial, teniendo en cuenta la necesidad de abordar el cambio de intención para dicha investigación;

Que, el artículo 154° del Reglamento para la Gestión Forestal, aprobado mediante Decreto Supremo N° 018-2015-MINAGRI, establece que la investigación científica del Patrimonio se aprueba mediante autorizaciones, salvaguardando los derechos del país respecto de su patrimonio genético nativo e indica que el SERFOR es competente para otorgar dichas autorizaciones cuando la investigación implique más de un ámbito regional, se utilicen especies categorizadas como amenazadas o CITES, y se realice el acceso a los recursos genéticos; asimismo, se precisa que el desarrollo de actividades de investigación básica taxonómica de flora silvestre, relacionadas con estudios moleculares con fines taxonómicos, sistemáticos, fitogeográficos, biográficos, evolutivos y de genética de la conservación, entre otras investigaciones sin fines comerciales, son aprobadas mediante autorizaciones de investigación científica;

Que, mediante Decreto Supremo N° 007-2013-MINAGRI, modificado por Decreto Supremo N° 016-2014-MINAGRI, se aprobó el Reglamento de Organización y Funciones - ROF del Servicio Nacional Forestal y de Fauna Silvestre - SERFOR, el mismo que en su literal g) del artículo 53°, señala como una de las funciones de la Dirección General de Gestión Sostenible del Patrimonio Forestal y de Fauna Silvestre, la de otorgar permisos de investigación o de difusión cultural con o sin colecta de flora y fauna, en el marco de las normas nacionales e internacionales vinculadas a la materia;



Que, mediante Resolución de Dirección Ejecutiva N° 060-2016-SERFOR/DE, del 01 de abril del 2016 aprueba los: "Lineamientos para el otorgamiento de la autorización con fines de investigación científica de flora y/o fauna silvestre", estableciendo las directrices específicas para el otorgamiento de la autorización con fines de investigación científica de flora y/o fauna silvestre, con o sin acceso a los recursos genéticos, fuera de Áreas Naturales Protegidas;

Que, mediante solicitud s/n, registrada el 02 de abril de 2018, el administrado solicitó a la Dirección General de Gestión Sostenible del Patrimonio Forestal y de Fauna Silvestre, la autorización con fines de investigación científica de flora, con colecta y con estudios moleculares, fuera de Áreas Naturales Protegidas, como parte del proyecto "Análisis de diversidad genética poblacional de *Aniba rosaeodora* Ducke "palo rosa" en la Amazonía peruana empleando marcadores ISSR", a desarrollarse en diferentes localidades de los distritos Fernando Loes, Alto Nanay, Napo y Putumayo, provincia de Maynas, el distrito de Tigre, provincia de Loreto, departamento de Loreto; distrito de Palcazu, provincia de Oxapampa, departamento de Pasco y el distrito de Masisea, provincia de Coronel Portillo, departamento de Ucayali;

Que, el Informe Técnico N° 0263-2018-MINAGRI-SERFOR-DGGSPFFS/DGSPF, de fecha 02 de mayo de 2018, emitido por la Dirección de Gestión Sostenible del Patrimonio Forestal concluye que, la solicitud de autorización con fines de investigación científica de



flora, con colecta y con estudios moleculares, fuera de Áreas Naturales Protegidas, como parte del proyecto "Análisis de diversidad genética poblacional de *Aniba rosaeodora* Ducke "palo rosa" en la Amazonía peruana empleando marcadores ISSR", tiene por finalidad evaluar la diversidad genética intrapoblacional e interpoblacional, medir el flujo de genes de las poblaciones y analizar las relaciones filogenéticas entre las poblaciones de *Aniba rosaeodora* "palo rosa" en la Amazonía peruana, lo cual contribuirá a generar mayor información científica que ayudará a planificar y diseñar estrategias de conservación y gestión de palo rosa;

Que, asimismo, el referido Informe señala que, la solicitud presentada cumple con lo dispuesto en el artículo 154° del Reglamento para la Gestión Forestal, aprobado mediante D.S. N° 018-2015-MINAGRI, así como, con los requisitos establecidos en el numeral 9 del Anexo 1 del D.S. N° 018-2015-MINAGRI y con los Lineamientos para el otorgamiento de la autorización con fines de investigación científica de flora y/o fauna silvestre, aprobados con Resolución de Dirección Ejecutiva N° 060-2016-SERFOR/DE, recomendándose la aprobación de la solicitud de Autorización con fines de investigación de flora silvestre;

De conformidad con la Ley Forestal y de Fauna Silvestre N° 29763, con el literal a) del artículo 8° del Protocolo de Nagoya, con el Reglamento para la Gestión Forestal, regulado por el D.S. N° 018-2015-MINAGR, con el literal g) del Artículo 53° del Reglamento de Organización y Funciones aprobado por Decreto Supremo N° 007-2013-MINAGRI y con el Texto Único Ordenado – TUO de la Ley N° 27444, Ley del Procedimiento Administrativo General.

#### SE RESUELVE:

**Artículo 1°.-** Otorgar la autorización con fines de investigación científica de flora, con colecta y con estudios moleculares, fuera de Áreas Naturales Protegidas, al señor Stalin Vasquez Guizado, identificado con DNI N° 45482567, como parte del proyecto "Análisis de diversidad genética poblacional de *Aniba rosaeodora* Ducke "palo rosa" en la Amazonía peruana empleando marcadores ISSR", desarrollarse en diferentes localidades de los distritos Fernando Lores, Alto Nanay, Napo y Putumayo, provincia de Maynas, el distrito de Tigre, provincia de Loreto, departamento de Loreto; distrito de Palcazu, provincia de Oxapampa, departamento de Pasco y el distrito de Masisea, provincia de Coronel Portillo, departamento de Ucayali, correspondiéndole el Código de Autorización N° **AUT-IFL-2018-026**.

**Artículo 2°.-** En la referida autorización para realizar investigación científica de flora silvestre, con colecta y estudios moleculares participarán los investigadores señalados en el Cuadro N° 01:

**Cuadro N° 01. Relación de Investigadores que participarán en el desarrollo del estudio**

Nombres y apellidos	Institución de procedencia	Cargo en el proyecto	Pasaporte/DNI
Stalin Juan Vasquez Guizado	Universidad Nacional de la Amazonía Peruana-UNAP	Responsable	DNI N° 45482567
Juan Carlos Castro Gómez	Unidad Especializada de Biotecnología del Centro de Investigaciones de Recursos Naturales (UEB-CIRNA) de la UNAP	Co-investigador	DNI N° 5363583



**Artículo 3º.-** La presente autorización comprende el cumplimiento de lo señalado en el Plan de Investigación presentado en la solicitud, así como, la colecta de muestras botánicas de hojas y flores de la especie *Aniba rosaeodora* Ducke "palo rosa", como parte del estudio "Análisis de diversidad genética poblacional de *Aniba rosaeodora* Ducke "palo rosa" en la Amazonía peruana empleando marcadores ISSR", durante el período de diez (10) meses de acuerdo al cronograma presentado por el administrado, contado a partir del día siguiente de la notificación de la presente Resolución de Dirección General.

**Artículo 4º.-** El titular de la autorización se obliga a:

- a) No extraer especímenes, ni muestras biológicas de flora silvestre no autorizada; no ceder los mismos a terceras personas, ni utilizarlos para fines distintos a lo autorizado.
- b) Depositar el material colectado en una institución científica nacional depositaria de material biológico, así como, entregar al SERFOR la constancia de dicho depósito. En casos debidamente justificados, y siempre que el material colectado no constituya holotipos ni ejemplares únicos, el depósito se podrá realizar en una institución distinta a la mencionada; para ello se requiere la autorización del SERFOR.
- c) Entregar a la Dirección General de Gestión Sostenible del Patrimonio Forestal y de Fauna Silvestre del SERFOR, una (01) copia del Informe Final en idioma español (incluyendo versión digital) como resultado de la autorización otorgada, copias del material fotográfico y/o slides que puedan ser utilizadas para difusión. Asimismo, entregar una (01) copia de las publicaciones producto de la investigación realizada en formato impreso y digital. El Informe Final deberá contener una lista taxonómica de las especies objeto de la presente autorización de colecta, en formato MS Excel. Esta lista deberá contar con sus respectivas coordenadas en formato UTM (Datum WGS84), incluyendo la zona (17, 18 o 19). Asimismo, incluir los datos de colecta de cada espécimen. El Informe Final que debe ser usado se encuentran en el Anexo 1 de la presente resolución.
- d) El cumplimiento de lo señalado en el literal b) y c) no deberá ser mayor a los seis (06) meses al vencimiento de la presente autorización.
- e) No contactar ni ingresar a los territorios comunales sin contar con la autorización de las autoridades comunales correspondientes.
- f) Sólo en el caso que por razones científicas acotadas se requiera enviar al extranjero parte del material colectado, el interesado deberá gestionar el correspondiente Permiso de Exportación ante la Dirección General de Gestión Sostenible del Patrimonio Forestal y de Fauna Silvestre del SERFOR, así como pasar el control respectivo. Los ejemplares únicos de los grupos taxonómicos colectados y holotipos sólo podrán ser exportados en calidad de préstamo.

**Artículo 5º.-** El titular de la autorización se compromete a:

- a) Retirar todo el material empleado para la ejecución del presente estudio una vez terminado el trabajo de campo y levantamiento de información biológica.
- b) Comunicar a la Dirección Ejecutiva de Gestión de Bosques y de Fauna Silvestre del Gobierno Regional de Amazonas, la entrada y salida del personal científico en campo, así como, informar sobre el tipo de muestras colectadas.
- c) Solicitar anticipadamente al SERFOR y dentro del plazo de vigencia de la resolución, cualquier cambio en las características de la investigación aprobada, que demanden la actualización de la presente resolución.
- d) Indicar el número de la Resolución en las publicaciones generadas a partir de la autorización concedida.





**Artículo 6°.-** La Dirección General de Gestión Sostenible del Patrimonio Forestal y de Fauna Silvestre del SERFOR, no se responsabiliza por accidentes o daños sufridos por el solicitante de la presente autorización durante la ejecución del Proyecto; asimismo, se reserva el derecho de demandar del Proyecto de investigación los cambios a que hubiese lugar en caso se formulen ajustes sobre la presente autorización.

**Artículo 7°.-** Notificar la presente resolución al señor Stalin Vasquez Guizado, transcribirla a la Dirección General de Información y Ordenamiento Forestal y de Fauna Silvestre, a la Dirección de Control de la Gestión del Patrimonio Forestal y de Fauna Silvestre, a la Administración Técnica Forestal y de Fauna Silvestre de Selva Central (Sede Oxapampa), a la Dirección Ejecutiva Forestal y de Fauna Silvestre de Ucayali y Dirección Ejecutiva del Programa Regional de Manejo de Recursos Forestales y Fauna Silvestre del Gobierno Regional de Loreto, para su conocimiento y fines correspondientes.

**Artículo 8°.-** Disponer la publicación de la presente Resolución en el Portal Web del Servicio Nacional Forestal y de Fauna Silvestre: [www.serfor.gob.pe](http://www.serfor.gob.pe).

Regístrese y Comuníquese



**ING. JUAN CARLOS GUZMÁN CARLÍN**  
Director General  
Dirección General de Gestión Sostenible del  
Patrimonio Forestal y de Fauna Silvestre  
Servicio Nacional Forestal y de Fauna Silvestre – SERFOR



## Anexo 2: Constancia de identificación de *Aniba rosaeodora* Ducke



UNAP

Centro de Investigación de  
Recursos Naturales  
Herbarium Amazonense – AMAZ

INSTITUCIÓN CIENTÍFICA NACIONAL DEPOSITARIA DE MATERIAL BIOLÓGICO  
CÓDIGO DE AUTORIZACIÓN AUT-ICND-2017-005

### CONSTANCIA N.º 032-2018-AMAZ-UNAP

El Coordinador del Herbarium Amazonense (AMAZ) del CIRNA, de la Universidad Nacional de la Amazonia Peruana

#### HACE CONSTAR:

Que, las 90 muestras botánica presentadas por **STALIN JUAN VASQUEZ GUIZADO**, bachiller de la Escuela Profesional de Ingeniería Forestal de la Facultad de Ciencias Forestales de la Universidad Nacional de la Amazonia Peruana, pertenecen a la Tesis titulada "ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA POBLACIONAL DE *Aniba rosaeodora* Ducke "palo de rosa" EN LA AMAZONÍA PERUANA EMPLEANDO MARCADORES ISSR" bajo la autorización de colecta RDG N° 162-2018-MINAGRI-SERFOR-DGGSPFFS las cuales fueron verificada y DETERMINADAS en este Herbarium Amazonense-AMAZ, CIRNA-UNAP, como sigue:

N°	FAMILIA	ESPECIE	NOMBRE COMÚN
1	LAURACEAE	<i>Aniba rosaeodora</i> Ducke	"palo de rosa"

A los 28 días del mes de noviembre de 2018 se expide la presente constancia al interesado para los fines que estime conveniente.

Atentamente,

  
  
 Blgo. Richard J. Huaranca Acostupa M. Sc. COORDINACIÓN  
 Coordinador del Herbarium AMAZ  
 CIRNA – UNAP

### Anexo 3: Datos pasaporte de 90 genotipos de *Aniba rosaeodora* Ducke

Numero de muestra	Nombre del genotipo	Región	Provincia	Distrito	Localidad	UTM	18 M	Altitud
1	Nanay-1	Loreto	Alto Nanay	Santa Maria del Nanay	Quebrada Curaca	9551691	638610	152
2	Nanay-2	Loreto	Alto Nanay	Santa Maria del Nanay	Santa Maria del nanay	9569683	644419	106
3	Nanay-3	Loreto	Alto Nanay	Santa Maria del Nanay	Santa Maria del nanay	9569689	644389	109
4	Nanay-4	Loreto	Alto Nanay	Santa Maria del Nanay	Santa Maria del nanay	9569727	644387	106
5	Nanay-5	Loreto	Alto Nanay	Santa Maria del Nanay	Santa Maria del nanay	9569721	644391	99
6	Alpahuayo-1	Loreto	Maynas	San Juan Bautista	Alpahuayo	9561154	675470	158
7	Alpahuayo-2	Loreto	Maynas	San Juan Bautista	Alpahuayo	9561182	675477	148
8	Alpahuayo-3	Loreto	Maynas	San Juan Bautista	Alpahuayo	9561208	675492	144
9	Alpahuayo-4	Loreto	Maynas	San Juan Bautista	Alpahuayo	9561236	675505	148
10	Alpahuayo-5	Loreto	Maynas	San Juan Bautista	Alpahuayo	9561247	675500	142
11	Alpahuayo-6	Loreto	Maynas	San Juan Bautista	Alpahuayo	9561262	675512	141
12	Alpahuayo-7	Loreto	Maynas	San Juan Bautista	Alpahuayo	9561300	675527	138
13	Zungarococha-1	Loreto	Maynas	San Juan Bautista	Zungarococha	9576628	681106	113
14	Zungarococha-2	Loreto	Maynas	San Juan Bautista	Zungarococha	9576631	681105	115
15	Zungarococha-3	Loreto	Maynas	San Juan Bautista	Zungarococha	9576625	681115	116
16	Zungarococha-4	Loreto	Maynas	San Juan Bautista	Zungarococha	9576650	681100	114
17	Tamshiyacu-1	Loreto	Maynas	Fernando Lores	Tamshiyacu	9559735	706059	112
18	Tamshiyacu-2	Loreto	Maynas	Fernando Lores	Tamshiyacu	9559801	706144	110
19	Tamshiyacu-3	Loreto	Maynas	Fernando Lores	Tamshiyacu	9559783	706148	120
20	Tamshiyacu-4	Loreto	Maynas	Fernando Lores	Tamshiyacu	9559741	706087	123
21	Tamshiyacu-5	Loreto	Maynas	Fernando Lores	Tamshiyacu	9559669	706071	111
22	Tamshiyacu-6	Loreto	Maynas	Fernando Lores	Tamshiyacu	9560651	705900	125
23	Tamshiyacu-7	Loreto	Maynas	Fernando Lores	Tamshiyacu	9560660	705877	105
24	Tamshiyacu-8	Loreto	Maynas	Fernando Lores	Tamshiyacu	9560676	705862	116
25	Tamshiyacu-9	Loreto	Maynas	Fernando Lores	Tamshiyacu	9560681	705840	121
26	Tamshiyacu-10	Loreto	Maynas	Fernando Lores	Tamshiyacu	9559356	706026	119
27	Tamshiyacu-11	Loreto	Maynas	Fernando Lores	Tamshiyacu	9559220	706283	129
28	Tamshiyacu-12	Loreto	Maynas	Fernando Lores	Tamshiyacu	9559223	706274	112
29	Tamshiyacu-13	Loreto	Maynas	Fernando Lores	Tamshiyacu	9559205	706296	115
30	Tamshiyacu-14	Loreto	Maynas	Fernando Lores	Tamshiyacu	9559076	706243	108
31	Tamshiyacu-15	Loreto	Maynas	Fernando Lores	Tamshiyacu	9559096	706281	119
32	Tamshiyacu-16	Loreto	Maynas	Fernando Lores	Tamshiyacu	9559092	706266	115
33	Tamshiyacu-17	Loreto	Maynas	Fernando Lores	Tamshiyacu	9559076	706269	110
34	Mairiricay-1	Loreto	Putumayo	Putumayo	Mairiricay	9726985	760695	136
35	Mairiricay-2	Loreto	Putumayo	Putumayo	Mairiricay	9726991	760701	132
36	Mairiricay-3	Loreto	Putumayo	Putumayo	Mairiricay	9726988	760714	134
37	Mairiricay-4	Loreto	Putumayo	Putumayo	Mairiricay	9727009	760707	132
38	Mairiricay-5	Loreto	Putumayo	Putumayo	Mairiricay	9727008	760702	131
39	Mairiricay-6	Loreto	Putumayo	Putumayo	Mairiricay	9726999	760690	130
40	Mairiricay-7	Loreto	Putumayo	Putumayo	Mairiricay	9726978	760714	125
41	Mairiricay-8	Loreto	Putumayo	Putumayo	Mairiricay	9726981	760726	126
42	Mairiricay-9	Loreto	Putumayo	Putumayo	Mairiricay	9726972	760715	125
43	Mairiricay-10	Loreto	Putumayo	Putumayo	Mairiricay	9726971	760716	127
44	Mairiricay-11	Loreto	Putumayo	Putumayo	Mairiricay	9726971	760713	123
45	Mairiricay-12	Loreto	Putumayo	Putumayo	Mairiricay	9726982	760719	128
46	Mairiricay-13	Loreto	Putumayo	Putumayo	Mairiricay	9727003	760729	124
47	Mairiricay-14	Loreto	Putumayo	Putumayo	Mairiricay	9726994	760726	126
48	Mairiricay-15	Loreto	Putumayo	Putumayo	Mairiricay	9727007	760725	124

49	Santamarta-1	Ucayali	Atalaya	Masisea	Santa Marta	8980940	604385	171
50	Santamarta-2	Ucayali	Atalaya	Masisea	Santa Marta	8980933	604388	169
51	Santamarta-3	Ucayali	Atalaya	Masisea	Santa Marta	8980925	604386	170
52	Santamarta-4	Ucayali	Atalaya	Masisea	Santa Marta	8980934	604388	169
53	Santamarta-5	Ucayali	Atalaya	Masisea	Santa Marta	8980923	604387	172
54	Santamarta-6	Ucayali	Atalaya	Masisea	Santa Marta	8980943	604348	171
55	Santamarta-7	Ucayali	Atalaya	Masisea	Santa Marta	8981608	604180	171
56	Santamarta-8	Ucayali	Atalaya	Masisea	Santa Marta	8981590	604184	171
57	Santamarta-9	Ucayali	Atalaya	Masisea	Santa Marta	8981587	604200	173
58	Santamarta-10	Ucayali	Atalaya	Masisea	Santa Marta	8981586	604182	171
59	Santamarta-11	Ucayali	Atalaya	Masisea	Santa Marta	8981588	604231	174
60	Santamarta-12	Ucayali	Atalaya	Masisea	Santa Marta	8981574	604258	176
61	Santamarta-13	Ucayali	Atalaya	Masisea	Santa Marta	8981667	604622	174
62	Santamarta-14	Ucayali	Atalaya	Masisea	Santa Marta	8981668	604623	174
63	Santamarta-15	Ucayali	Atalaya	Masisea	Santa Marta	8981674	604632	175
64	Santamarta-16	Ucayali	Atalaya	Masisea	Santa Marta	8981978	604874	177
65	Santamarta-17	Ucayali	Atalaya	Masisea	Santa Marta	8981965	604878	175
66	Santamarta-18	Ucayali	Atalaya	Masisea	Santa Marta	8981959	604892	175
67	Santamarta-19	Ucayali	Atalaya	Masisea	Santa Marta	8981528	604688	172
68	Santamarta-20	Ucayali	Atalaya	Masisea	Santa Marta	8980586	604483	164
69	Mariadehuajoya-1	Loreto	Maynas	Napo	Maria de Huajoya	9838429	536797	120
70	Mariadehuajoya-2	Loreto	Maynas	Napo	Maria de Huajoya	9835376	537866	125
71	Mariadehuajoya-3	Loreto	Maynas	Napo	Maria de Huajoya	9833880	535209	116
72	Mariadehuajoya-4	Loreto	Maynas	Napo	Maria de Huajoya	9835834	531637	121
73	Mariadehuajoya-5	Loreto	Maynas	Napo	Maria de Huajoya	9838277	528614	118
74	Mariadehuajoya-6	Loreto	Maynas	Napo	Maria de Huajoya	9841544	530843	118
75	Mariadehuajoya-7	Loreto	Maynas	Napo	Maria de Huajoya	9839223	533377	123
76	Mariadehuajoya-8	Loreto	Maynas	Napo	Maria de Huajoya	9838429	535515	140
77	Mariadehuajoya-9	Loreto	Maynas	Napo	Maria de Huajoya	9841788	535393	135
78	Mariadehuajoya-10	Loreto	Maynas	Napo	Maria de Huajoya	9840811	537164	129
79	Huajoya-1	Loreto	Maynas	Napo	Huajoya	9852750	540889	146
80	Huajoya-2	Loreto	Maynas	Napo	Huajoya	9851987	543454	152
81	Huajoya-3	Loreto	Maynas	Napo	Huajoya	9852140	545255	134
82	Huajoya-4	Loreto	Maynas	Napo	Huajoya	9854918	544828	142
83	Huajoya-5	Loreto	Maynas	Napo	Huajoya	9855834	543179	127
84	Huajoya-6	Loreto	Maynas	Napo	Huajoya	9855010	539087	131
85	Huajoya-7	Loreto	Maynas	Napo	Huajoya	9854949	537744	135
86	Huajoya-8	Loreto	Maynas	Napo	Huajoya	9856109	539912	145
87	Huajoya-9	Loreto	Maynas	Napo	Huajoya	9855651	543576	155
88	Huajoya-10	Loreto	Maynas	Napo	Huajoya	9854430	544858	149
89	Huajoya-11	Loreto	Maynas	Napo	Huajoya	9852873	547362	138
90	Huajoya-12	Loreto	Maynas	Napo	Huajoya	9851040	546660	151