

**Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua
UNAN-León
Facultad de Ciencias
Departamento de Biología**



**Estudio preliminar de la diversidad genética entre 16 procedencias
de *Sabal mexicana* Mart, del Pacífico de Nicaragua, aplicando la
técnica RAPD.**

Tesis de Licenciatura.

Autor :
Br. Domingo Joaquín Guido Novoa.

Tutora :
Ph.D . M^a. Verónica Díaz Vargas.

2005.

Dedicatoria

A mi madre:

M^a. Eugenia Novoa Guerrero.

Agradecimientos

Al concluir este trabajo, quiero expresar mi gratitud a todas aquellas personas e instituciones que de diferentes formas brindaron su colaboración e hicieron posible la realización de este estudio.

A la **Ph. D. M^a Verónica Díaz Vargas** mi mayor agradecimiento por haberme dado la oportunidad de realizar este estudio, haber aceptado ser tutora, asesora y colaboradora en la dirección de esta tesis, por haber asumido como propios los problemas encontrados y ayudar a resolverlos. Gracias Dra. Díaz por su paciencia y constancia.

Al programa de Genética Molecular enmarcado en la cooperación del hermanamiento **UNAN-León – UAH** (Trienio 2003 – 2005). A través del cual surgió el apoyo al proyecto.

Al Proyecto dinámica ecológica del bosque seco y fomento del cultivo de la palma pacaña (*Sabal mexicana* Mart) en el Occidente de Nicaragua. (MAGFOR - PROFOR, UNAN - LEON), y en especial a dos de sus miembros, **M. Sc. Rebeca Pastora** y **M. Sc. M^a Inés Dávila**, quienes colectaron las muestras de mi estudio (semillas de palma).

A la Comunidad Autónoma de Madrid (**CAM**), la cual financió este estudio.

Al **Br. David Alberto Cerda Granados** por haberme ayudado en la parte práctica de laboratorio y por sacarme de apuros en las muchas interrupciones causadas en el transcurso del estudio. Gracias David, por tu constancia, apoyo y aporte de valiosos conocimientos, y por ser muy buen compañero y amigo.

Al **Gabinete de Ecología del Medio Ambiente** donde pude hacer uso de máquinas para investigación y levantado de texto durante el desarrollo del estudio y especialmente a su responsable **M. Sc. Pedrarias Dávila Prado**.

Al Lic. Jorge Isaac Flores Méndez le doy las gracias por su apoyo incondicional, confianza y paciencia que me brindó, por su gran disposición a colaborar y por sus valiosas sugerencias para la presentación de este trabajo.

A la **M. Sc. Lourdes Callejas Solórzano** por estar siempre dispuesta a contestar mis preguntas y brindarme sugerencias cuando las necesité.

Al **M. Sc. Rolando Dolmus** por haberme ayudado en la georreferenciación de los sitios de muestreos, con ayuda de los mapas cartográficos de INETER.

Al **M. Sc. Iván Guevara** quien me facilitó tiempo en su máquina para la conversión de coordenadas geográficas a UTM.

A la **Lic. Ana de Jesús Reyes Zavala** de MOVITERRA le agradezco por haberme ayudado en la realización del mapa de los sitios de muestreos, con ayuda de los mapas cartográficos de INETER y el programa Arc view 3.2, 1996.

A todos los **profesores del Dpto. de Biología** por la enseñanza que obtuve de ellos en el transcurso de la carrera.

A **Aleyda Trujillo**, secretaria del Dpto. de Biología, por todas las atenciones brindadas durante la carrera.

A todos **mis amigos** y a todos **mis compañeros** de grado que de diferentes formas en ocasiones obtuve alguna ayuda de ellos.

A **mi familia** por la confianza, motivación y apoyo constante que me brindaron.

Abreviaturas

μg	microgramo
μl	microlitro
μM	micromolar
CTAB	bromuro trimetil amonio de cetilo
d.a.p	diámetro a la altura del pecho
m/h	metros de altura
dNTP	2' – deoxinucleósido 5' trifosfato
EDTA	ácido etilendiaminotetracético
M	molar
mM	milimolar
ng	nanogramos
nm	nanómetro
NTSYS	Numerical Taxonomy and Multivariate Analisis System
pb	pares de bases
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PM	Peso Molecular
RAPD	ADN Polimorfico Amplificado al Azar
TBE	Tris –Borato- EDTA
TE	Tris- EDTA
Tris	2 – amino – 2 (hidroximetil) – 1 – 1 – 3 – propanodiol
UPGMA	Unweighted Pair Group Method Average
U	Unidades de Enzima
UV	Ultravioleta
V	voltio
W	watio

Índice

Resumen.....	1
Introducción.....	3
Objetivos	6
Marco Teórico	8
1. Generalidades de <i>Sabal mexicana</i> Mart.....	9
1.1. Taxonomía de <i>S. mexicana</i>	9
1.2. Sinonimos y Nombres comunes	9
1.3. Morfología y Reproducción	10
1.4. Distribución y Ecología de <i>S. mexicana</i>	10
1.5. Utilización de <i>S. mexicana</i>	11
2. Conservación.....	11
3. Variabilidad Genética	12
3.1. Origen	13
3.2. Detección y estimación.	13
4. PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa).....	15
5. RAPD (ADN Polimórfico Amplificado al Azar).	16
5.1. Ventajas de la técnica RAPD.	18
5.2. Desventajas	18
5.3 Aplicación de la técnica RAPD.....	19
Material y Método.....	21
1. Material Vegetal.....	22
2. Pulverización de la Semilla de <i>S. mexicana</i>	23
3. Extracción del ADN total.....	24
4. Chequeo y Cuantificación del ADN.	24
5. Ejecución de la técnica RAPD.	26
6. Proceso de amplificación.....	27
7. Chequeo de la amplificación.....	28
8. Análisis de datos.	29
Resultados y Discusión.....	31
1. Patrones de bandas	32
2. Agrupamientos de procedencias de acuerdo a similitud genética	36
Conclusiones.....	44
Recomendaciones	46
Bibliografía	48
Anexos	59



Resumen



La técnica RAPD (ADN Polimórfico Amplificado al Azar) se aplicó en el Laboratorio de Genética Molecular de la UNAN-León, en procedencias de *Sabal mexicana* del Pacífico de Nicaragua, con el propósito de evaluar de forma preliminar la variabilidad genética presente en esta especie. Extrayendo el ADN (a partir de semillas individuales de un total de 48 muestras de 16 procedencias de los Departamentos de León, Chinandega y Masaya) según el método de Möller y col. (1992), (con pequeñas modificaciones), fue amplificado por la técnica RAPD (Williams y col, 1990) basada en la PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) con 6 cebadores de Operon. Con los marcadores obtenidos de la amplificación se calculó los porcentajes de polimorfismos y se realizó un análisis de agrupamiento de las muestras por sus similitudes genéticas, con el paquete estadístico NTSYS (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System) versión 1.5 (Rohlf, 1993).

Los 6 cebadores generaron un total de 42 bandas de las cuales 39 resultaron polimórficas lo que equivale a un 92.8%. Las procedencias que presentaron mayor polimorfismo con el conjunto de cebadores fueron las que tienen mayor número de muestras, destacándose el Limonal, S^{ta}. Rosa y S^{ta}. Teresa con 91.11%, 86.60% y 70.98% respectivamente. Los cebadores más efectivos en detectar polimorfismo en todas las procedencias fueron N-09 con 75% y AE-16 y E-12 ambos con 72%.

El agrupamiento de las muestras de acuerdo a sus similitudes genéticas refleja alta diversidad genética entre ellas, ya que las relaciona con un bajo porcentaje de similitud (20%) en 9 grupos, donde la mayoría de las muestras se ubican independientemente de la procedencia a que pertenecen y de su localización geográfica y se disgregan de tal manera que muestras de procedencias muy distantes geográficamente se agrupan más cercanamente. Este resultado parece indicar que no existe mucha diferencia genética entre las distintas procedencias y que posiblemente la mayor diferencia genética esté dentro de las procedencias.



Introducción



La palma de techo (*Sabal mexicana* Mart.) es una planta no maderable, que desde tiempos inmemoriales ha estado asociada a la actividad antropogénica, mediante el uso de sus hojas para techar construcciones y casas rurales (Ramos y Quezada, 1980). Actualmente representa un recurso económico importante especialmente para muchas familias nicaragüenses de sectores populares que la utilizan en el mercado artesanal (sus hojas se usan para fabricar sombreros, cestas, abanicos etc.) así como en el sector turístico en el techado de ranchos rústicos. Además del valor ornamental y paisajístico que la especie tiene (SEMARNAT. 1997; Armas y Canales, 2003).

Durante años las poblaciones de *S. mexicana* han sufrido serias perturbaciones ocasionadas por actividades antropogénicas (incremento de la industria turística, avance de la frontera agrícola etc.) lo que ha provocado la rápida destrucción de las poblaciones de esta especie en el occidente del país. Las consecuencias ecológicas que están generando estas perturbaciones son evidentes, sin embargo la pérdida y reducción de su diversidad genética debe evaluarse ya que puede tener drásticas consecuencias para la sobrevivencia de la especie, puesto que se ha comprobado que la pérdida o baja diversidad genética en muchas especies se relaciona con la reducción en su capacidad de reproducción y sobrevivencia (fitness reproductivo). Además es precisamente la diversidad genética la que le confiere a las poblaciones el potencial para evolucionar y adaptarse a los cada vez más continuos y acelerados cambios ambientales (Frankham y col., 2002).

Dada la creciente demanda de este recurso, es necesario llevar a cabo actividades de conservación y recuperación de palmares que permita un uso sostenible de la especie y para ello se requiere realizar diversos estudios entre ellos el de detectar y estimar la diversidad genética presente en las diferentes procedencias. La importancia del estudio sobre los niveles y distribución de la diversidad genética en poblaciones naturales para diseñar eficaces estrategias de



conservación y manejo ha sido reconocida por diferentes autores (Hogbin y Peakall, 1999; Hamrick, 1994; González y Sosa, 2002), así como por instituciones internacionales, por ejemplo, el Programa de Medio Ambiente de las Naciones Unidas (PNUMA) y la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) consideran los recursos genéticos como prioridad en los programas de conservación de la biodiversidad (Hogbin, 1999; Frankham y col., 2002).

En los años recientes han sido desarrolladas una diversidad de técnicas para detectar la variabilidad genética a nivel del ADN basadas en la PCR, siendo RAPD una de ellas, la cual ha sido muy utilizada desde el inicio de los años 90 en una serie de estudios de caracterización y evaluación de la diversidad genética de diferentes especies (Devos y Gale, 1992; Soliman y col., 2003; Nesbitt y col., 1996, entre otros). Hasta el momento no se ha encontrado reportado ningún tipo de estudio con esta técnica en *S. mexicana*.

El presente trabajo tiene por objetivo realizar un estudio preliminar de la diversidad genética de 16 procedencias de palma (*Sabal mexicana* Mart.) de los Departamentos de León, Chinandega y Masaya de Nicaragua, para determinar la cantidad y distribución de su diversidad genética, cuya información permitiría guiar hacia decisiones acertadas en la elaboración de propuestas para la conservación, reforestación y manejo de la palma paceña, en beneficio de productores que disponen de este recurso y de los sectores populares que hacen uso de él, haciéndolo sostenible a niveles acorde a la demanda del mismo y en beneficio del medio ambiente dado el valor intrínseco de la especie.



Objetivos



Objetivo General:

Determinar la diversidad genética presente en 16 procedencias de *Sabal mexicana* Mart., del Pacífico de Nicaragua a través de la técnica RAPD.

Objetivo Específico:

Establecer los agrupamientos de los individuos de diferentes procedencias en base a su índice de similitud genética.



Marco Teórico



1. Generalidades de *Sabal mexicana* Mart.

S. mexicana pertenece a la familia Arecaceae, y son las palmas uno de los grupos de mayor significancia y extrema diversidad en las monocotiledóneas (Jones, 1994).

1.1. Taxonomía de *S. mexicana*.

De acuerdo a Cronquist (1988), la ubicación taxonómica de la especie es:

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Liliopsidae

Sub-clase: Arecidae

Orden: Arecales

Familia: Arecaceae

Genero: *Sabal*

Especie: *Sabal mexicana* Mart.



Foto1: Imágenes de *Sabal mexicana* Mart.
www.azarboretum.org/plantist/sabal.

1.2. Sinonimos y Nombres comunes

Aún cuando *Sabal mexicana* es reconocida con su nombre científico, se refieren a esta especie, usando sinónimos: *Inodes mexicana* (Mart.) Standl.; *Sabal guatemalensis* Becc. (Stevens y col., 2001) y en muchas localidades con nombres comunes: palma paceña, palma redonda, palma del guano, etc (SEMARNAT. 1997; Paguaga, 2000).



1.3. Morfología y Reproducción

S. mexicana es una planta leñosa, no maderable de hasta 25 m/h y d.a.p de hasta 30 cm, provista de estípites no ramificados, con cicatrices foliares circulares delgadas, especialmente hacia el ápice. Las palmas jóvenes perturbadas, cubiertas casi completamente por restos notables de pecíolos foliares muertos, hojas alternas, costado palmeadas, con pecíolos acanalados en el haz, vaina fibrosa y ápice profundamente bífido (foto 1) (Stevens y col., 2001; Salas, 1993).

S. mexicana es una planta solitaria de reproducción sexual, con flores hermafroditas bisexuales pequeñas poco vistosas, dispuestas en grandes inflorescencias paniculadas (espádices multifloros) de 1-1.8 m de largo, protegidas por una espata leñosa, perianto compuesto por 6 piezas dispuestas en dos series de prefloración valvada, ovario súpero trilobular, uniovulados, pétalos y sépalos glabros. Fruto esférico drupáceo, con mesocarpio carnoso y endocarpio membranáceo. Contiene una sola semilla de 8-12 mm de diámetro, muy oleosa, endospermo homogéneo y embrión lateral. Según la fenología de *Sabal mexicana*, esta especie florece en abril y fructifica entre mayo y junio (Stevens y col., 2001; SEMARNAT. 1997). Hasta el momento no se ha encontrado reportado si *S. mexicana* es una planta autógama o alógama.

1.4. Distribución y Ecología de *S. mexicana*.

Sabal mexicana Mart. es considerada la especie más ampliamente distribuida de manera silvestre, entre la familia Arecaceae en Centro y Norte América principalmente. Es una especie pionera, muchas veces forma extensos palmares y en ocasiones se encuentra asociada con otras especies, crece en selvas bajas caducifolias, típica en regiones tropicales y subtropicales, también se localiza en el viejo mundo y en el nuevo mundo se distribuye desde Estados



Unidos hasta el norte de Sudamérica, común en suelos poco drenados, flujo de lava basáltica, terrazas arcillosas o arenosas, principalmente en zonas del pacífico y norcentral (CONABIO. 2000).

En Nicaragua es común encontrarla en los Departamentos de Chinandega, León, Masaya, Managua, y Madriz (Armas y Canales, 2003 y Salas, 2002).

1.5. Utilización de *S. mexicana*.

La palma paceña es de gran importancia para muchas familias Nicaragüenses, tiene fuerte demanda en el mercado artesanal local y regional, ya que sus recursos se prestan a múltiples usos en las actividades antropogénicas. Las hojas de *S. mexicana* se usan para techar construcciones y casas rurales, y es comercializada para la elaboración de ranchos turísticos. Los troncos de palmas adultas son usados para construir casas, puentes y postes para cercos (SEMARNAT, 1997 y CONABIO, 2000). Los cogollos se utilizan para la elaboración de variadas artesanías. Los frutos son complemento forrajero para diversas especies animales y las plantas pequeñas tienen fines ornamentales, sirven como centro de jardines (Ramos y Quezada, 1980).

2. Conservación

Generalmente los recursos forestales son aprovechados, seleccionándose y extrayéndose directamente de las poblaciones naturales con criterios meramente comerciales, dándose una explotación altamente selectiva lo que conduce al empobrecimiento genético de una especie. Se han sugerido diferentes alternativas para la conservación de las especies, entre ellas: la conservación *ex situ*, como el establecimiento de plantaciones forestales que aún en pequeña escala pueden evitar la degradación de los bosques naturales, jardines botánicos y huertos semilleros en los que los árboles procedan de semillas colectadas de



todos los sitios de la distribución geográfica de las especies (Gillies y col.1999); la conservación *in situ* como el establecimiento de parques y reservas naturales (Farjon y Styles,1997) o bien combinando la conservación *in situ* y el aprovechamiento racional del recurso (Rasmussen, 1994).

Al igual que las especies forestales maderables, la palma paceña (*S. mexicana*) ha sufrido una reducción masiva de individuos, lo que se traduce en una reducción del tamaño de sus áreas de distribución natural y los niveles de diversidad genética están generalmente correlacionados con el tamaño de las poblaciones. Se ha reportado que en algunas especies del género *Sabal* la mayor parte de la diversidad genética está dentro de las poblaciones, por ello cuando se reduce una población se está perdiendo gran parte de su diversidad genética (González y Sosa, 2002). La FAO (1993) considera que mientras no se disponga de mayor información, la conservación más segura es la de mantener el mayor conjunto posible de procedencias dentro de su dominio natural geográfico y ecológico, priorizando las áreas geográficas o ecológicas donde las poblaciones sean probablemente diferentes genéticamente (por ejemplo las que se encuentran en el límite de su distribución natural).

3. Variabilidad Genética

La diversidad genética es la que proporciona a las especies, el potencial para responder a cambios ambientales desfavorables (disposición a evolucionar) y consiste en la diversidad de alelos o genotipos presentes en la población (Fontdevila y Moya, 1999).

Existen diferentes factores que inciden en el nivel de diversidad genética de una especie, entre ellos están: su biología reproductiva, tipo de cruzamiento (autofecundación o fecundación cruzada), si la especie es perenne o anual, su distribución (endémica o con amplia distribución) etc. Generalmente las alógamias



y las que tienen amplia distribución presentan elevada diversidad genética (González y Sosa, 2002).

3.1. Origen

Generalmente la variabilidad genética en poblaciones naturales puede darse por alteraciones en la estructura o número de cromosomas o directamente en las bases del ADN, muchas veces influenciadas por las condiciones del ambiente, relacionado a procesos evolutivos y de especiación, tales como; flujo de genes, deriva genética, selección natural y principalmente mutaciones (Díaz, 2001). La variabilidad a nivel de ADN puede darse por cambios puntuales (transiciones, transversiones, inserciones y deleciones, en las bases nucleotídicas), la variabilidad por reestructuración del ADN se da por multiplicación repetitiva ya sea de unos pocos nucleótidos (minisatélites y microsátélites) o de secuencias codificantes completas (dispersas o en tándem) y por elementos transponibles (transposones y retrotransposones), que cambian de posición fragmentos de ADN y multiplican fragmentos de ADN respectivamente. En los cromosomas puede darse variabilidad por reestructuración cromosómica (afectan partes de la estructura de un cromosoma), como deleciones, duplicaciones, inversiones y translocaciones. También se da variabilidad por cambios en el número de cromosomas (poliploidía y aneuploidía) y por recombinación durante la meiosis (entrecruzamiento y segregación al azar de los cromosomas) en el que se genera gran cantidad de variabilidad genética (Fontdevila y Moya, 1999).

3.2. Detección y estimación.

La variabilidad genética en poblaciones naturales se expresa como polimorfismo morfológico, proteico y a nivel del ADN los que también se denominan marcadores morfológicos, bioquímicos y moleculares respectivamente.



Las primeras evaluaciones de polimorfismo fueron hechas, enfocadas en caracteres morfológicos, detectando así variabilidad en base al fenotipo externo, pero estos no son suficientes para hacer una verdadera estima de la variabilidad genética ya que suelen presentar variaciones por estar frecuentemente influenciadas por condiciones ambientales (Gallego, 1994). Por lo tanto se requieren de técnicas estadísticas muy elaboradas para poder separar los efectos del ambiente de los efectos del genotipo, lo cual es muy difícil, y más aún debe tenerse en cuenta el hecho de que muchos caracteres cuantitativos no están determinados por un solo gen si no por poligenes (Díaz, 2001).

Los marcadores bioquímicos se han desarrollado como métodos alternativos de análisis indirectos en estudios del genoma basados en el principio de que si las proteínas están codificadas por genes, el polimorfismo proteico debe ser un reflejo del polimorfismo genético a nivel del ADN. El estudio se realiza por electroforesis, es una técnica sencilla que analiza gran número de muestras a bajo costo y en corto tiempo. (Gallego, 1994). Sin embargo estos marcadores no son tan convenientes ya que muchas especies son monomórficas para muchos loci enzimáticos, el número de alozimas que pueden estudiarse es limitado, no todos los cambios a nivel genómico son detectables a nivel proteico, ya que en ocasiones ocurren mutaciones silenciosas que no son reflejadas en los productos proteicos, además hay que considerar que si las poblaciones pasaron por un cuello de botella carecen de loci polimórficos (Díaz, 2001). Un cuello de botella se da cuando una población sufre una reducción drástica por un acontecimiento que tiene poca o ninguna relación con la supresiones habituales de la selección natural, provocándose una pérdida de de la variabilidad genética entre la descendencia de los pocos sobrevivientes (Audesirk, 2003 y Curtis, 2000).

Los estudios moleculares a nivel del ADN se han convertido en una poderosa herramienta en análisis de genética poblacional, conservación, mejora de especies forestales (Subramanian y col., 2000) e identificación del grado de



diferenciación entre especies a través de análisis filogenéticos, ya que permiten tipificar individuos mediante regiones únicas del ADN. Los marcadores moleculares exploran gran cantidad del genoma, lo cual es importante considerando que diferentes regiones del genoma están sometidas a diferentes presiones de selección; en el ADN codificante (exones) actúa la selección natural y en el ADN no codificante (intrones) se da el doble de sustitución nucleotídica en relación a la región codificante (Díaz 2001). Además dichos marcadores permiten analizar un gran número de muestras en corto tiempo, identificando polimorfismo intra e interespecífico, no sujeto a condiciones del ambiente y son sumamente importantes ya que pueden aplicarse a cualquier tipo de especie y permiten obtener mayor cantidad de información, mejorando así la forma de clasificación tradicional (basada en caracteres morfológicos). Estos marcadores pueden ser detectados haciendo uso de diferentes técnicas de Biología Molecular entre ellas la técnica RAPD, la cual se basa en la amplificación por la PCR (Fontdevila y Moya, 1999 y Nebauer y col., 1999).

4. PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa).

Hasta mediados de los años 80 el único método para obtener grandes cantidades de un fragmento de ADN de interés, se realizaba *in vivo* por el proceso conocido como clonación de ADN, para ello se inserta el gen de interés en vectores apropiados y se introducen en bacterias para multiplicarlo, lo que implica una actividad muy laboriosa que requiere de mucho tiempo y no siempre es exitosa. En 1984 Kary Mullis desarrolló un método que permite, a partir de una muestra muy pequeña de ADN obtener millones de copias *in vitro* de forma análoga a como en la célula se replica el ADN, en cuestión de horas lo que ha simplificado el proceso de la clonación (Watson y col., 1991).

Esta técnica denominada Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) es un método rápido y sencillo que utiliza una ADN polimerasa termoresistente



(obtenida de bacterias que habitan en aguas termales) para resistir las altas temperaturas a las que se somete la muestra. También se requiere de un par de cebadores (oligonucleótidos) con complementariedad de bases con los extremos del fragmento de ADN que se quiere amplificar. La reacción se lleva a cabo en un aparato llamado termociclador programado con el número de ciclos (de 30-40) y temperaturas requeridas. Cada ciclo comprende tres pasos; 1. Desnaturalización del ADN a copiar (molde) a 93°C-95°C para obtener hebras sencillas y que pueda ocurrir el siguiente paso. 2. Hibridación del cebador con el ADN molde por complementariedad de bases, ésta temperatura depende de la longitud del cebador y de su contenido de bases y 3. Elongación o síntesis de las nuevas hebras por la incorporación de los dNTPs y la formación del enlace fosfodiéster realizada por la ADN polimerasa a partir del extremo 3' de los cebadores, a la temperatura óptima de la enzima (72°C). Luego de un determinado “n” número de ciclos, existen 2^n copias por cada molécula existente al inicio de la reacción. Los productos de la PCR pueden ser secuenciados directamente (Watson y col., 1991).

La PCR es una herramienta muy influyente en el rápido avance de los mapas y proyectos de secuenciación de genoma con lo cual ha revolucionado el mundo de la investigación genética ubicándose como pieza clave en diversa áreas de estudio, entre ellas biología molecular, biotecnología, genética evolutiva y de poblaciones, mejora de especies, salud pública, medicina, microbiología, botánica, zoología, medicina forense, antropología y geología, etc (Watson y col., 1991).

5. RAPD (ADN Polimórfico Amplificado al Azar).

Esta técnica basada en la PCR fue desarrollada por Williams y col. (1990) y consiste en la utilización de un único y corto cebador de secuencia arbitraria (10-20 nucleótidos) dirigidos al azar a la secuencia del genoma, por lo que se le denomina ADN Polimórfico Amplificado al Azar o RAPD. Si el cebador presenta



homología (complementariedad de bases) con segmentos del ADN bajo estudio, en las dos hebras en sentido opuesto (Sheri y col., 1993) y lo suficientemente cercanas (aproximadamente 2000 – 200pb) ocurre la amplificación (Tingey y del Tufo, 1993). Dado que la complejidad del genoma eucariota es lo suficientemente grande permite que existan estas condiciones. La amplificación generalmente se da simultáneamente en varias regiones del ADN. (Watson y col., 1991). Los productos de la amplificación se observan como bandas, cada una de las cuales representaría un locus con dos alelos, el alelo dominante es el amplificable y el recesivo el no a amplificado (Díaz, 2001).

Sin embargo cuando se elige un cebador al azar pueden ocurrir tres casos diferentes: a) Que con el cebador elegido no se obtenga ninguna amplificación (no encontró homología), b) Que se obtengan productos de la misma longitud y en el mismo número en todos los individuos analizados (bandas monomórficas) y c) Que los patrones de bandas obtenidos no sean los mismos en los individuos de la población analizada, detectando así polimorfismo. Se consideran bandas polimórficas las que están presentes en un individuo, pero ausentes en otro o tomando en cuenta el criterio de que un *locus* es polimórfico si la frecuencia del alelo más raro en el total de muestras analizadas es superior a 0.05 (Puertas, 1999), o igualmente si cuyo alelo más común tiene una frecuencia que no supera el 0.95, (Fontdevila y Moya, 1999) y es precisamente por exhibir polimorfismos que los RAPDs pueden ser usados como marcadores genéticos. Sin embargo como no todos los cebadores producen amplificación o detectan polimorfismo, cuando se va a analizar un gran número de muestras, inicialmente para ahorrar recursos se puede elegir un pequeño número de individuos a analizar para ensayar y elegirlos los mejores cebadores a aplicar finalmente en toda la muestra (Williams y col. 1990).

El polimorfismo detectado puede ser debido a inserciones o deleciones, pero en mayor frecuencia se da por mutaciones puntuales en el ADN (Díaz, 2001).



5.1. Ventajas de la técnica RAPD.

Es una técnica sencilla, rápida y de bajo costo (no requiere de aparatos altamente sofisticados) que permite estudiar un gran número de muestras en poco tiempo, requiere de poco ADN y puede ser aplicada en cualquier organismo, sin necesidad de tener conocimiento previo del ADN del organismo o especie que se va a estudiar y además se pueden seleccionar y elegir sólo los mejores marcadores (bandas polimórficas) entre todos los que se generan (Díaz 2001).

5.2. Desventajas

Es un marcador dominante, en el sentido que no permite distinguir homocigotos de heterocigotos, por lo que no proporcionan directamente información alélica. Bandas que poseen el mismo peso molecular y coemigran en los geles no son necesariamente homólogas (no provienen del mismo locus) lo cual puede confundir la interpretación fenotípica de las mismas, pueden presentarse problemas de baja reproducibilidad entre los laboratorios (Fontdevila y Moya, 1999). También la presencia de bandas de baja intensidad puede llevar a cometer errores en la lectura de los perfiles de bandas (Díaz, 2001).

Para minimizar los efectos de dominancia en los RAPDs Lynch y Milligan (1994) y Apóstol y col., (1996) han propuesto estrategias para estimar los parámetros de manera similar a los obtenidos de tejidos haploides o marcadores codominantes (Isabel y col., 1995 y Aruana, 1993) señalan que los errores al analizar los datos se obvian o disminuyen cuando se eligen solo las bandas intensamente teñidas y claramente discernibles y que aparecen consistentemente en distintas réplicas. Además diferentes autores (Beaumont y col., 1996. Reiseberg, 1996., Wu y col., 1999, entre otros) han reportado experimentos de hibridación en los que la proporción de fragmentos homólogos resultaron mayor



del 90%, lo que indica que la mayoría de las bandas que coemigran en las especies estudiadas y analizadas por hibridación proceden del mismo locus.

A pesar de los inconvenientes señalados, la técnica RAPD ha sido extensamente utilizada en diferentes tipos de estudios y aplicada en una gran diversidad de especies.

5.3 Aplicación de la técnica RAPD.

Entre los diferentes tipos de estudios en los que se aplica esta técnica se pueden citar: Detección de polimorfismos entre individuos de las poblaciones estudiadas (por ejemplo en estudios de caracterización de diversidad genética en poblaciones naturales), determinación de relaciones genéticas a niveles intraespecíficos (entre cultivares o variedades), identificación y tipificación de variedades (con propósitos de protección de variedades patentadas), en estudios de sistemática y taxonomía molecular, en análisis de flujo de genes, en determinar relaciones filogenéticas y construcción de mapas genéticos (Arnholdt, 2000). También este tipo de marcador es utilizado para identificar bandas ligadas a algún carácter de interés agronómico o económico. En este caso la información se utiliza en un programa de selección, llamada Selección Asistida por Marcadores (MAS) que presenta una serie de ventajas con respecto a la selección convencional, siendo la principal de ellas la de acortar el tiempo del proceso de selección en programas de mejora genética, debido a que estos marcadores pueden detectarse en cualquier fase del desarrollo de la planta (Martínez y Tohme, 2001).

En relación a la amplia variedad de organismos o especies en las que se ha aplicado esta técnica se pueden citar:



En plantas forestales se reportan gran cantidad de trabajos entre ellos los estudios de diversidad genética en poblaciones mesoamericanas de caoba, (*Switenia macrophylla*) por Gilles y col., (1999), en *Eucalyptus gobulus*, NesBitt, y col., (1996), en *Pinus leucodermis*, Bucci y col., (1997), en *Quercus petrea*, De Greef y col., (1998), en *Digitalis obscura*, Nebauer y col., (1999), González y Sosa (2002) estudiaron la Diversidad Genética e Hibridación de la Palmera Canaria (*Phoenix canariensis*), Díaz, (2001) caracterizó la diversidad genética de 10 poblaciones naturales de *Pinus oocarpa* de Nicaragua a través de diferentes marcadores moleculares, entre ellos los RAPDs.

En plantas cultivadas, Molnar y col. (1999) aplicaron RAPD para determinar genes de resistencia a las manchas reticuladas en cebada, Devos y Gale (1992) hicieron un estudio en trigo como una fuente de marcadores genéticos, Subramanian y col., (2000) identificaron ADN polimórfico en cultivos de maní, Picado (1997) evaluó relaciones genéticas entre y dentro de cuatro cultivares importados de *Jatropha curcas* L., en esta misma especie William y Ramos (2000) evaluaron la variabilidad genética en 7 cultivares, De Bustos y col. (1998) emplearon esta técnica en poblaciones silvestres de cuatro especies del genero *Hordeum* (*poaceae*), García-Mas y col. (2000) evaluaron la diversidad genética en melón utilizando diferentes marcadores entre ellos RAPDs.

En otras especies se encuentran reportes de diferentes trabajos, por ejemplo el realizado por Apóstol y col. (1996) en *Aedes aegyptis* en Puerto Rico, la caracterización de especies del género *Candida* por Lehmann y col. (1992) y estudios de relaciones filogenéticas en *Chaenomeles* (*Rosaceae*) por Bartish y col., (2000).



Material y Método



Este estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Genética Molecular del Departamento de Biología, Facultad de Ciencias de la UNAN – León, con una duración de 12 meses (comprendido en el periodo de Octubre 2002 a Diciembre 2004), para analizar por medio de marcadores RAPDs muestras de *S. mexicana*, las cuales consistieron en semillas suministradas por el Proyecto "Dinámica Ecológica del Bosque Seco y Fomento del Cultivo de la Palma Paceaña (*Sabal mexicana* Mart) en el Occidente de Nicaragua", las cuales fueron colectadas en palmares de sitios naturales que han sido menos perturbados (poca intervención), con diferencias en el tipo de suelo y la altitud a la que crecen, con un número de plantas mínimas por palmar no menor de 5 individuos, y distancia entre las plantas de 50 a 100 m, con frutos maduros y semillas en óptimas condiciones y en buen estado fitosanitario para tomar como muestra de 1-5 semillas por planta. (Dávila, 2003).

1. Material Vegetal.

Para realizar el análisis de variabilidad en la palma se recibió del proyecto antes mencionado, las semillas colectadas de 48 plantas pertenecientes a 16 procedencias de los departamentos de Chinandega, León y Masaya (Anexo, tabla 2 y figura 1).

Se tomó una semilla individual del total recibida por cada muestra para realizarle la extracción de ADN y amplificarlo con la técnica RAPD. Cabe citar que se hizo el análisis de todas las muestras recibidas, sin discriminar la cantidad desigual con que algunas procedencias estaban representadas (de 1 a 5 muestras) lo cual aparece en la siguiente tabla:



Nº de muestras	Código	Procedencia	Municipio	Dpto.
1,	PTS	Los Patos	Telica	León
2, 3, 4,	LJ	Las Lajitas	La Paz Centro	León
5, 6, 7, 8, 9,	RO	Santa Rosa	Abangasca	León
10, 11, 12, 13, 14,	LI	El Limonal	P. Morazán	Chinandega
15, 16, 17, 18, 19,	PI	La Picota	El Viejo	Chinandega
20, 21,	NE	R. los Negritos	Momotombo	León
22, 23, 24, 25, 26,	TR	Santa Teresa	El Tintal	Chinandega
27, 28, 29, 30, 31,	OL	Santa Olivia	La Paz Centro	León
32, 33,	AC	Aguas Caliente	La Paz Centro	León
34, 35, 36, 37,	KL	Kilaca	El Viejo	Chinandega
38, 39, 40, 41,	PP	El Papalonal	Mina el Limón	León
42, 43,	CT	El Cortezal	Mina el Limón	León
44, 45,	CC	La Concepción	La Concepción	Masaya
46	NGT	Nagarote	Nagarote	León
47	MUN	Muna	Cinco Pino	Chinandega
48	PAL	Los Palmares	Momotombo	León

Tabla 1. Muestras recibidas de *Sabal mexicana* Mart. suministradas por el proyecto "Dinámica Ecológica del Bosque Seco y Fomento del Cultivo de la Palma Paceaña (*Sabal mexicana* Mart) en el Occidente de Nicaragua" .

2. Pulverización de la Semilla de *S. mexicana*.

Para obtener el tejido vegetal de la semilla, primero se quita la cubierta (Testa) con ayuda de un bisturí, se busca la zona donde está situado el embrión, se hace un limado con ayuda de una lima metálica y el polvo fino obtenido se



almacena a una temperatura de -20°C mientras no se proceda la extracción del ADN.

3. Extracción del ADN total.

Se extrajo el ADN a cada semilla utilizando el método de Möller y col., (1992) con pequeñas modificaciones. En un tubo Eppendorf de 1.5 ml, se depositó 0.02 g del tejido pulverizado al que se le agregó 500 μl de buffer de extracción TES (Tris 100mM, pH=8.00, EDTA 10 mM y SDS 2%) en ese momento también se le adiciona 5 μl de proteinasa K (20 mg/ml) y se incuba durante 1h en baño maría a 60°C con agitaciones esporádicas. Posteriormente se añadió 140 μl de NaCl 5M y 65 μl de CTAB al 10%, para incubar de nuevo en baño maría a 65°C por sólo 10 min. Luego se le adicionan 700 μl de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1), y se deja reposar a 0°C durante 30 min. Se centrifuga 10 min a 12,000 rpm y a 4°C para recuperar el sobrenadante y colocarlo en un nuevo tubo agregándole 225 μl de acetato de amonio 5M y se deja 30 min a 0°C . Se centrifuga de nuevo en las mismas condiciones y el sobrenadante se coloca en un nuevo tubo para añadirle 510 μl de isopropanol y se deja precipitando el ADN a -20°C durante 12 h o más. El ADN se recupera por centrifugación en las condiciones anteriores. Se elimina el sobrenadante y el sedimento se lava 2 veces consecutivas con 500 μl de etanol frío al 70%, en cada caso se recupera el ADN por centrifugación. El sedimento se deja secar por 30 min a temperatura ambiente y se resuspende en 30 μl de Buffer TE (Tris 10mM y EDTA 1mM). Para eliminar el ARN se trata con 5 μl de ARNasa (10ng/ml) incubándolo a 37°C en baño maría por 10 min y finalmente el ADN se conserva a -20°C .

4. Chequeo y Cuantificación del ADN.

La calidad del ADN se verifica mediante electroforesis en un minigel de agarosa al 1%, el cual se prepara fundiendo la agarosa diluida en buffer TBE 1X

(Tris 0.445M, Ácido Bórico 0.445M y EDTA 0.01M) por ebullición. Se deja enfriar hasta aproximadamente 40°C y se vierte en una minicubeta la que contiene peine para la formación de pocillos y se deja a temperatura ambiente para su gelificación. Se coloca el gel dentro de la cámara de electroforesis que contiene buffer TBE 1X en cantidad suficiente para que cubra el gel y se procede a quitarle el peine para cargar las muestras de ADN. Las muestras se preparan en un volúmen final de 10 μ l agregando 5 μ l de ADN, 4 μ l de agua estéril y 1 μ l de tampón de carga (EDTA 10mM, glicerol 20% y azul de bromofenol 0.25%) (Maniatis y col. 1982) para detectar su migración. Las muestras se depositan en los pocillos, se cubre la cámara y se conecta a una fuente de poder para hacerlas migrar a 5 V/cm durante 20-30 min, Posteriormente el gel se tiñe por inmersión en bromuro de etidio (0.5 μ g/ μ l) y se visualiza sobre una lámpara UV, como aparece en la siguiente foto.



Foto 2. Imágenes de los diferentes momentos en la realización de la electroforesis.

La concentración del ADN se cuantificó en un espectrofotómetro (Shimadzu UV-120-02). Para ello, en un tubo de 1.5 ml se agrega 5 μ l de ADN y 995 μ l de agua estéril, se mezcla bien y se deposita en una cubeta de cuarzo en la cual se hace la medición. El aparato debe ser calibrado antes de medir cada muestra con agua estéril (blanco).



a)

b)

c)

Foto 3. Imagen del Espectrofotómetro utilizado para la cuantificación de muestras de ADN. a) Espectrofotómetro Shimadzu UV-120-02, b) Depósito de la muestra y c) Calibrado del aparato.

5. Ejecución de la técnica RAPD.

Para obtener los marcadores RAPD se utilizó el procedimiento descrito por Williams y col. (1990). Inicialmente se realizó amplificaciones con los cebadores de secuencia arbitraria disponibles en el Laboratorio de Genética Molecular, en solo tres muestras escogidas al azar, para seleccionar los primers que detecten polimorfismo y produzcan patrones de bandas reproducibles y fácilmente analizables, los que posteriormente se utilizan con las 48 muestras totales a analizar.

Mezcla de reacción:

Las reacciones PCR se realizaron en un volumen final de 25 μ l y la mezcla consistió de:

<u>Componentes</u>	<u>volúmen</u>	<u>Concentración</u>
Agua estéril	14.3 μ l	Volúmen necesario para completar 25 μ l.
Tampón	2.5 μ l	(10 mM Tris-HCl, PH8.3, 1.5mM MgCl ₂ y 50 mM KCl).
dNTP	2 μ l	200 μ M de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP).
Cebador	1 μ l	0.2 μ M
Taq	0.2 μ l	1U
Polimerasa		
ADN	5 μ l	5ng / μ l

6. Proceso de amplificación.

Las amplificaciones se llevaron a cabo en un termociclador, en el cual las muestras de ADN se someten a diferentes temperaturas y tiempos. El programa utilizado inicia con una desnaturalización a 92° C por 3 min, seguida de 45 ciclos. En cada ciclo se da la desnaturalización del ADN a 92° C por 30 seg, la hibridación con el cebador a 42°C por 1 min y la elongación de las nuevas hebras a 72°C por 30 seg. Concluidos los 45 ciclos se da una elongación final a 72°C por 8 min. El último paso programado es a 4°C por tiempo indefinido, para conservar adecuadamente las muestras mientras no sean retiradas del termociclador.



a)

b)

c)

Foto 4. Imágenes del termociclador GeneAmp PCR System 2700 utilizado. a) Termociclador, b) y c) colocación de la muestra.

7. Chequeo de la amplificación.

A cada tubo con la muestra amplificada se le agregó 5 μ l de tampón de carga para separar los productos de la amplificación (fragmentos de ADN) por electroforesis en geles de agarosa al 1.4% a 5V/cm. En el primer pocillo del gel se depositó un marcador de peso molecular (1Kb Ladder GIBCO,BRL con bandas de 75 a 12,216 pb) (Anexo, figura 2). Los geles se tiñeron por inmersión en bromuro de etidio 0.5 μ g/ ml, durante 30 min., luego se visualizaron y fotografiaron bajo luz UV.

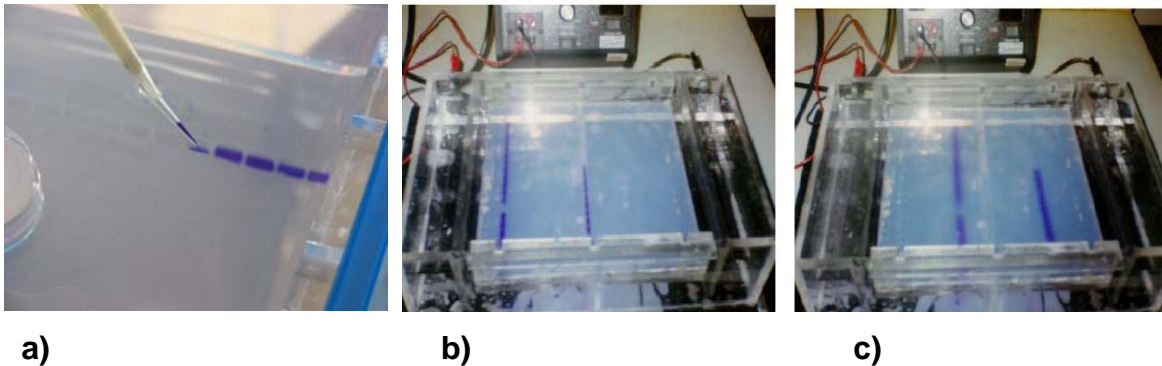


Foto 5. Imágenes de la migración electroforética, a) Depósito de muestras en los pocillos del gel., b) y c) Inicio y finalización de la electroforesis respectivamente.

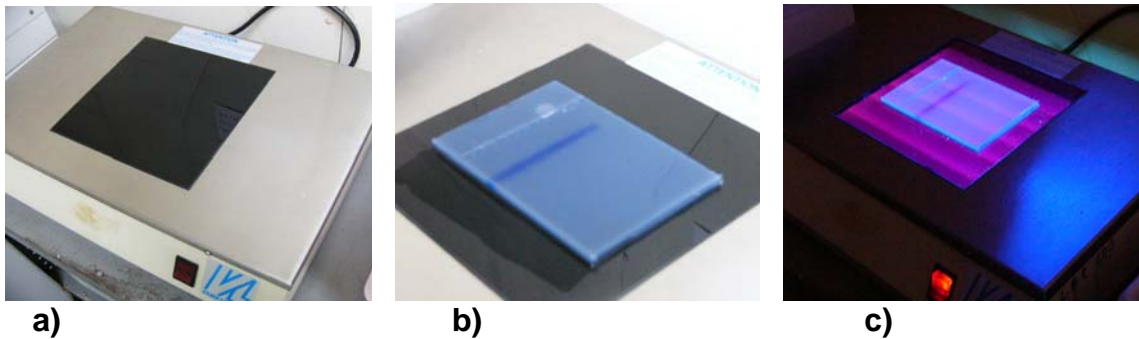


Foto 6. Imágenes de Visualización de las muestras. a) Lámpara UV, b) y c) antes y durante la visualización.



8. Análisis de datos.

Los productos de la amplificación se observan en gel como bandas, las cuales son designadas como monomórficas ó polimórficas. Tomando en cuenta la proporción de *loci* polimórficos y el criterio de que un *locus* es polimórfico si la frecuencia del alelo más raro en el total de muestras analizadas es superior a 0.05 (Puertas, 1999), ó si cuyo alelo más común tiene una frecuencia que no supera el 0.95 (Fontdevila y Moya, 1999), se determina el total de bandas obtenidas con cada cebador en todas las procedencias analizadas. En base a esto, se calcula el porcentaje de bandas polimórficas, para obtener la media de cada cebador con todas las procedencias analizadas y la media de cada procedencia con todos los cebadores aplicados.

También con las bandas polimórficas se construye una matriz de presencia-ausencia designándole un 1 a la banda presente y un 0 a la banda ausente, a partir de la cual el paquete informático NTSYS (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System) versión 1.5 (Rohlf, 1993) realiza el cálculo del coeficiente de similitud entre las muestras a partir del coeficiente de Jaccard (S_j) considerando la fórmula:

$$I = \frac{\text{Número de bandas comunes}}{\text{N}^\circ \text{ de bandas comunes} + \text{N}^\circ \text{ de bandas diferentes}}$$

Luego con los datos calculados construye una matriz de similitud y a partir de ésta realiza una agrupación (dendrograma) en el que se representan las similitudes genéticas entre los individuos analizados, usando el método de análisis UPGMA (Unweighted Pair Group Method Average) a partir de la fórmula:

$$D = 1,2 \frac{d_1 + d_2}{2}$$

Considerando que las 4 procedencias representadas por solo una muestra, pueden sesgar los resultados, se realiza además un análisis eliminando a estas



procedencias para elaborar una segunda tabla de porcentajes de polimorfismo y un segundo dendrograma con 12 procedencias.



Resultados y Discusión



1. Patrones de bandas

En este estudio se analizaron por la técnica RAPD, 48 muestras de ADN (Anexo, foto 7) de 16 diferentes procedencias de *S. mexicana* del Pacífico de Nicaragua, (Anexo, figura 1). Para estudiar la diversidad genética en estas localidades inicialmente se probaron un total de 41 cebadores de Operon en solo 3 muestras seleccionados al azar. De ellos se eligieron 6 cebadores que presentaron productos de amplificación (bandas) reproducibles, fáciles de discernir (con buena separación entre bandas y de mayor intensidad) y que detectaban polimorfismo. Los 6 cebadores elegidos fueron ensayados en las 48 muestras produciendo un total de 42 bandas. Todos los cebadores produjeron bandas polimórficas en todas las procedencias, (Anexos, tabla 5). El número de bandas generados por cada cebador aparece en la siguiente tabla:

Cebador	Secuencia 5'——3'	Bandas monomórficas	Bandas polimórficas	Nº total de bandas
N – 09	TGC CGG CTT G	2	4	6
AE – 16	TCC GTG CTG A	0	11	11
N – 12	GGG ACG TTG G	0	9	9
E – 12	TTA TCG CCC C	0	5	5
A – 04	AAT CGG GCT G	0	5	5
E – 19	GTC AGG GCA A	1	5	6
TOTAL		3	39	42
Media		0.5	6.5	7

Tabla 3. Designación y secuencia de los cebadores empleados, N° total de bandas, N° de bandas monomórficas y polimórficas obtenidas con cada cebador en el conjunto de las muestras



Los cebadores que produjeron mayor número de bandas fueron AE-16 y el N-12 con 11 y 9 bandas respectivamente, teniendo los restantes cebadores un promedio de 4.7 bandas. En este caso se aprecia que los cebadores que generaron mayor número de bandas, generaron también mayor polimorfismo, lo que no tiene que ser así necesariamente (Díaz.2001). Un ejemplo de los patrones de bandas obtenidos puede verse con el cebador AE-16 (Anexo, foto 8) en los individuos de todas las procedencias. Los diferentes perfiles de amplificación generados con los 6 diferentes cebadores en todos los individuos analizados se representan por figuras. (Anexos, figuras 3, 4 y 5).

Las bandas obtenidas con todos los cebadores presentaron un peso molecular que varió de 2000 a 200 pb. Del total de 42 bandas obtenidas 39 resultaron polimórficas, es decir, sólo 3 monomórficas (Anexos, figuras 3 a 5), lo que podría indicarnos la posible cantidad de variabilidad genética presente en estas procedencias. No se encontró una banda exclusiva que identifique o diferencie a una determinada procedencia, pero sí las bandas que comparten las diferentes procedencias están en diferentes frecuencias.

Al obtener con la frecuencia de bandas polimórficas el porcentaje de polimorfismo generado en las 16 procedencias con todos los cebadores y por cebador con cada una de las procedencias, se puede observar que la frecuencia de bandas polimórficas es por lo general diferente en cada una de las procedencias con el conjunto de los cebadores, debido posiblemente a la variabilidad presente dentro de las procedencias como a la diferencia en el tamaño de las muestras de cada procedencia, por ejemplo las procedencias que presentaron mayor porcentaje de polimorfismos fueron El Limonal (91.11%) seguida de S^{ta}. Rosa (86.60%) y S^{ta}. Teresa (70.98%) representadas en este estudio con 5 individuos y las que menor polimorfismo presentaron fueron las que están representadas por un único individuo Los Patos (31.43%) Nagarote (49%), Muna (22.72%) y Los Palmares (47.19%), datos que puede verse a continuación:



N°	Muestras	Procedencia	N° de Bandas / Cebadores						= 39 Media
			4	11	9	5	5	5	
			N- 09	AE -16	N - 12	E - 12	A - 04	E -19	
1.	1	Los Patos	2 (50)	4 (36.36)	2 (22.22)	1 (20)	1 (20)	2 (40)	2 (31.43)
2.	3	Las Tejitas	2 (50)	7 (63.63)	6 (66.66)	4 (80)	2 (40)	2 (40)	3.83 (56.72)
3.	5	S ^{ta} . Rosa	4 (100)	9 (81.81)	7 (77.77)	4 (80)	5 (100)	4 (80)	5.5 (86.60)
4.	5	El Limonal	4 (100)	11 (100)	6 (66.66)	4 (80)	5 (100)	5 (100)	5.83 (91.11)
5.	5	La Picota	3 (75)	11 (100)	6 (66.66)	3 (60)	2 (40)	4 (80)	4.83 (70.28)
6.	2	Los Negritos	3 (75)	4 (36.36)	5 (55.55)	3 (60)	2 (40)	2 (40)	3.17 (51.15)
7.	5	S ^{ta} . Teresa	3 (75)	10 (90.90)	9 (100)	3 (60)	2 (40)	3 (60)	5 (70.98)
8.	5	S ^{ta} . Olivia	3 (75)	8 (72.72)	7 (77.77)	4 (80)	3 (60)	3 (60)	4.67 (70.92)
9.	2	Aguas Caliente	2 (50)	7 (63.63)	8 (88.88)	5 (100)	2 (40)	4 (80)	4.67 (70.42)
10.	4	Kilaca	3 (75)	9 (81.81)	6 (66.66)	3 (60)	3 (60)	3 (60)	4.5 (67.24)
11.	4	El Papalonal	3 (75)	8 (72.72)	5 (55.55)	4 (80)	2 (40)	4 (80)	4.33 (67.21)
12.	2	El Cortezal	3 (75)	3 (27.27)	4 (44.44)	1 (20)	3 (60)	4 (80)	3 (51.12)
13.	2	La Concepción	3 (75)	8 (72.72)	4 (44.44)	5 (100)	2 (40)	3 (60)	4.17 (65.36)
14.	1	Nagarote	2 (50)	5 (45.45)	5 (55.55)	2 (40)	3 (60)	2 (40)	3.16 (49)
15.	1	Muna	1 (25)	1 (9.09)	2 (22.22)	1 (20)	2 (40)	1 (20)	1.33 (22.72)
16.	1	Los Palmares	2 (50)	1 (90.90)	2 (22.22)	2 (40)	2 (40)	2 (40)	1.83 (47.19)
Media			2.69 (67.25)	6.62 (60.18)	5.19 (57.67)	3.13 (62.60)	2.56 (51.20)	3 (60)	

Tabla 5. Porcentaje de bandas polimórficas obtenidas con RAPD. Número y porcentaje (entre paréntesis) de bandas polimórficas obtenidas con cada cebador en cada procedencia analizada, en la última línea, media de cada cebador con todas las procedencias y en la última columna, media de cada procedencias con todos los cebadores.



Al eliminar a las 4 procedencias representadas con un único individuo, en las 12 procedencias restantes de la siguiente tabla, aumenta el rendimiento de cada uno de los 6 cebadores con las 12 procedencias, ejemplo el N-09 de un 67.25% pasa a un 75%.

N ^o	Mues- tras	Procedencia	N ^o de Bandas / Cebadores						= 39
			4	11	9	5	5	5	
			N- 09	AE -16	N - 12	E - 12	A - 04	E - 19	Media
1.	3	Las Tejitas	2 (50)	7 (63.63)	6 (66.66)	4 (80)	2 (40)	2 (40)	3.83 (56.72)
2.	5	S ^{ta} . Rosa	4 (100)	9 (81.81)	7 (77.77)	4 (80)	5 (100)	4 (80)	5.5 (86.60)
3.	5	El Limonal	4 (100)	11 (100)	6 (66.66)	4 (80)	5 (100)	5 (100)	5.83 (91.11)
4.	5	La Picota	3 (75)	11 (100)	6 (66.66)	3 (60)	2 (40)	4 (80)	4.83 (70.28)
5.	2	Los Negritos	3 (75)	4 (36.36)	5 (55.55)	3 (60)	2 (40)	2 (40)	3.17 (51.15)
6.	5	S ^{ta} . Teresa	3 (75)	10 (90.90)	9 (100)	3 (60)	2 (40)	3 (60)	5 (70.98)
7.	5	S ^{ta} . Olivia	3 (75)	8 (72.72)	7 (77.77)	4 (80)	3 (60)	3 (60)	4.67 (70.92)
8.	2	Aguas Caliente	2 (50)	7 (63.63)	8 (88.88)	5 (100)	2 (40)	4 (80)	4.67 (70.42)
9.	4	Kilaca	3 (75)	9 (81.81)	6 (66.66)	3 (60)	3 (60)	3 (60)	4.5 (67.24)
10.	4	El Papalonal	3 (75)	8 (72.72)	5 (55.55)	4 (80)	2 (40)	4 (80)	4.33 (67.21)
11.	2	El Cortezal	3 (75)	3 (27.27)	4 (44.44)	1 (20)	3 (60)	4 (80)	3 (51.12)
12.	2	La Concepción	3 (75)	8 (72.72)	4 (44.44)	5 (100)	2 (40)	3 (60)	4.17 (65.36)
Media			3 (75)	7.92 (72)	6.1 (68)	3.58 (72)	2.75 (55)	3.42 (68.40)	

Tabla 6. Porcentaje de bandas polimórficas obtenidas con RAPD, **sin las procedencias representadas con solo una muestra.** Número y porcentaje (entre paréntesis) de bandas polimórficas obtenidas con cada cebador en cada procedencia analizada, en la última línea, media de cada cebador con todas las procedencias y en la última columna, media de cada procedencias con todos los cebadores.



El aumento en el porcentaje quizás sería mayor si no existiesen otras procedencias con aún muy bajo número de muestras (de 2 y 3 individuos).

El N-09 fue el cebador que produjo mayor porcentaje de polimorfismo a pesar de que es el que generó menor número de bandas (sólo 4) y el que generó menor porcentaje de polimorfismo fue el A-04 con 55% (tabla 6), sin embargo todos los cebadores generaron más de 50% de polimorfismo. No necesariamente el que genera mayor número de bandas es el que produce mayor polimorfismo, ya que depende de cuántas de las bandas generadas son polimórficas. Por ejemplo el cebador AE-16 que generó 11 bandas, tiene un porcentaje de polimorfismo menor (72%) con respecto al N-09 (75%), por que no todas las procedencias presentan las 11 bandas, como ya se mencionó anteriormente las bandas están en diferentes frecuencias (el cebador AE-16 tiene un promedio de 7.92 bandas polimórficas entre todas las procedencias) (tabla 6).

2. Agrupamientos de procedencias de acuerdo a similitud genética

En el análisis de agrupamiento de acuerdo a la similitud genética obtenida a partir de la matriz presencia-ausencia construida con los marcadores RAPDs (Anexo, tabla4), se observan que todas las muestras de *S. mexicana* se lograron diferenciar con los cebadores analizados con una alta variabilidad genética entre las muestras.

La figura 6 presenta el dendrograma que refleja el agrupamiento con las 48 muestras de *S. mexicana*, representantes de 16 diferentes procedencias del Pacífico de Nicaragua y la figura 7 representa el agrupamiento con las 44 muestras que se mantienen luego de haber eliminado las procedencias representadas con una sola muestra, para obtener a partir de éstas el análisis de los resultados de el agrupamiento de las muestras de acuerdo a su similitud genética de 12 procedencias distintas.

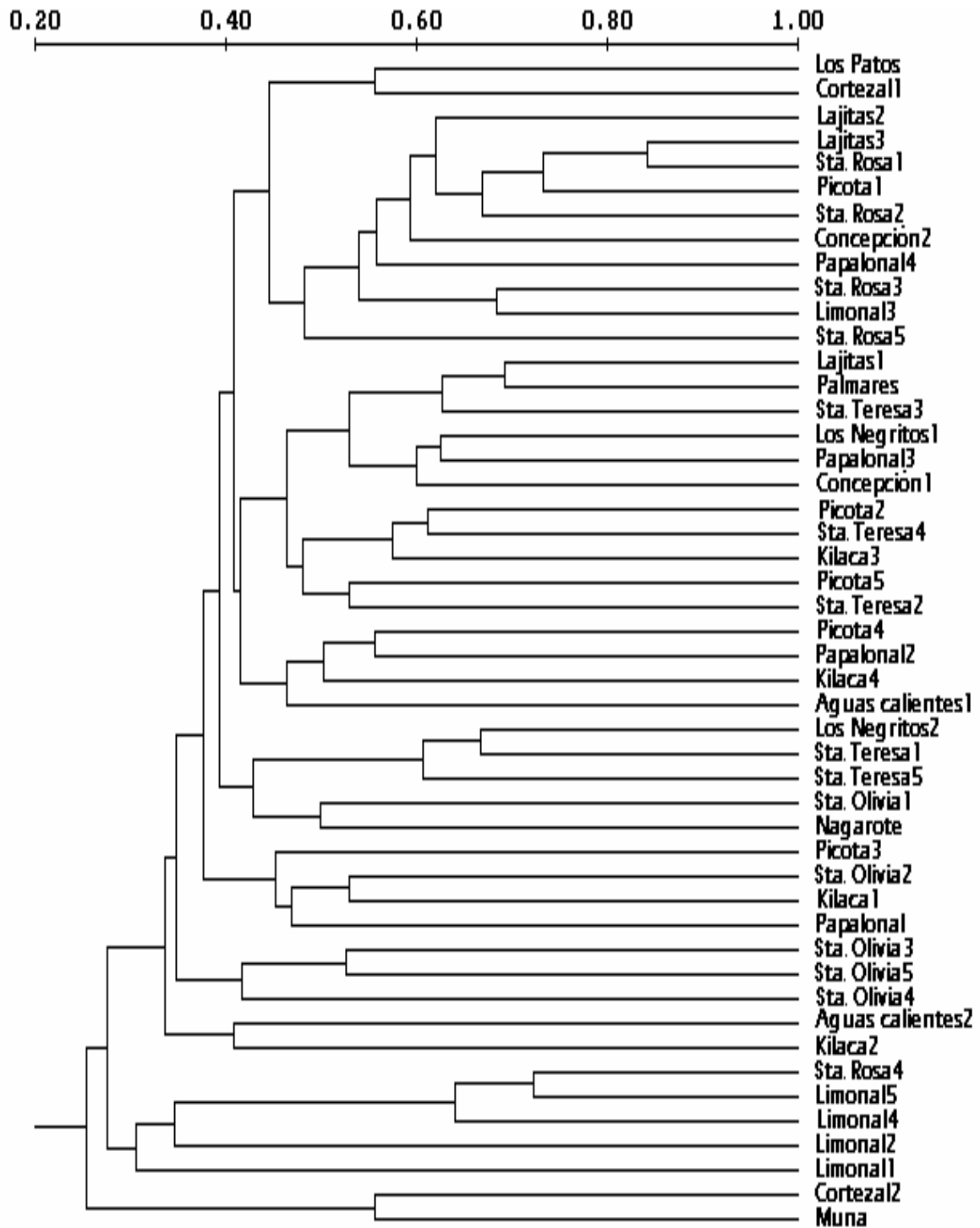


Figura 6. Dendrograma obtenido con el método de agrupamiento UPGMA, a partir de las distancias genéticas de *Sabal mexicana* Mart., en las 16 procedencias analizadas.

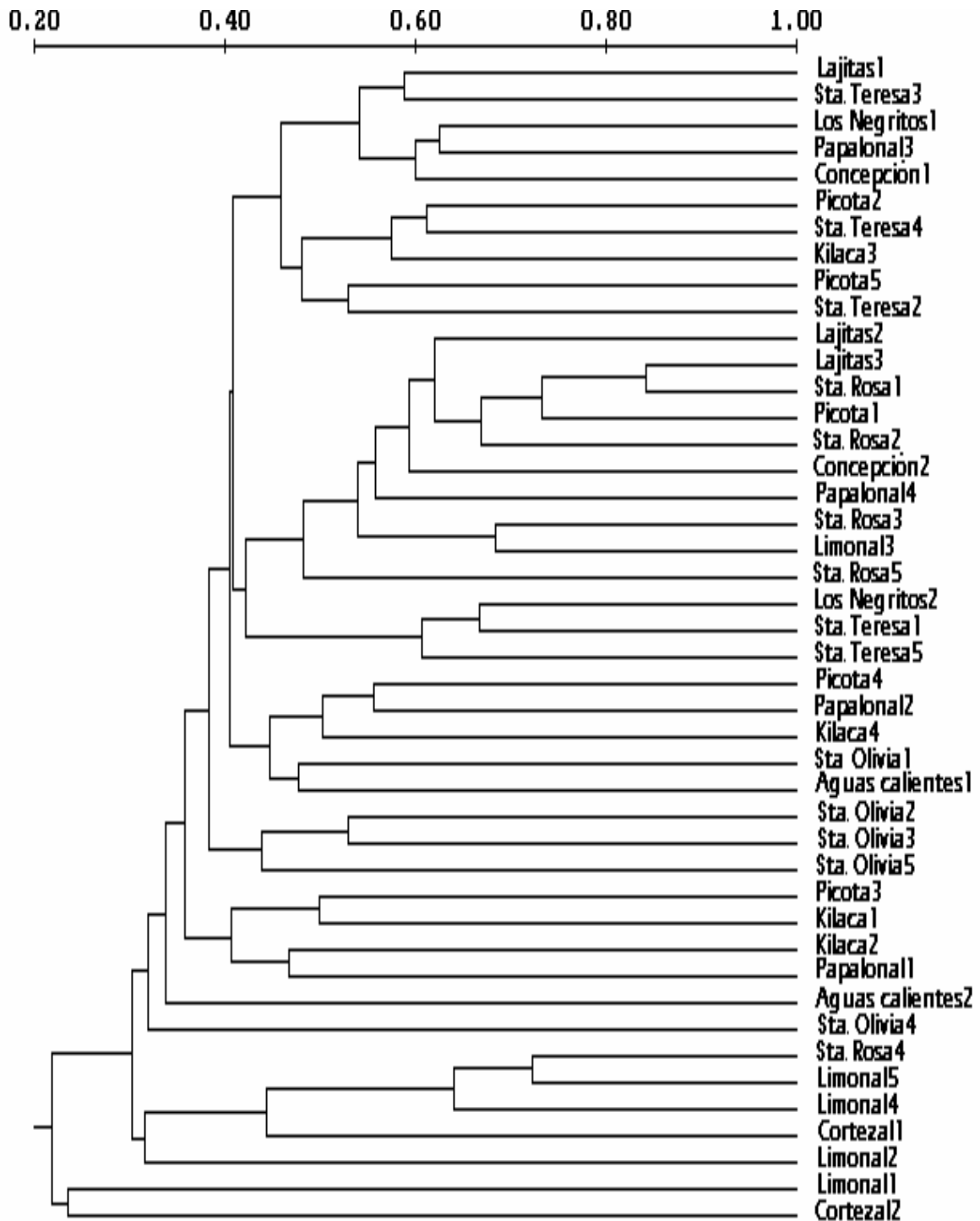


Figura 7. Dendrograma obtenido con el método de agrupamiento UPGMA, a partir de las distancias genéticas de *Sabal mexicana* Mart., eliminando las procedencias representadas con una sola muestra y considerando solo 12 de las 16 procedencias analizadas.



En la figura 7 se observa que todas las muestras se relacionan con un bajo porcentaje de similitud genética (20%) lo que significa hay una alta diversidad genética entre las ellas. Las muestras se ubican en un total de nueve grupos principales, indistintamente de la procedencia a la que pertenecen y se disgregan a través del dendrograma aunque pertenezcan a una misma procedencia, sin embargo algunas de éstas presentan una tendencia a mantenerse cercanas entre sí, como es el caso de 4 muestras de El Limonal y S^{ta}. Olivia (donde 3 de ellas forman un solo grupo) y 2 muestras de S^{ta}. Rosa, S^{ta}. Teresa, Kilaca, Las Lajitas y el Cortezal.

Cuando se trató de inferir alguna relación entre las similitudes genéticas y las distancias geográficas entre las procedencias, en algunos casos raros ciertas muestras de procedencias cercanas geográficamente se ubican también cerca en el dendrograma, por ejemplo algunas muestras de Kilaca y la Picota (ambas procedentes del Viejo-Chinandega). Las procedencias que en el mapa aparecen más cercanas geográficamente por ejemplo Las Lajitas, S^{ta}. Olivia, los Negritos, Aguas Calientes, (Dpto. de León), todas sus muestras no se agrupan cercanamente en el dendrograma, a excepción de las muestras de S^{ta} Olivia con las de Aguas Caliente que en grupos distintos quedan bastante cercanas en el dendrograma.

Los resultados del agrupamiento de las diferentes procedencias de *Sabal mexicana* estudiadas no permite establecer grupos de acuerdo a la localización geográfica de cada una de ellas probablemente debido a diversos factores: Uno de ellos es el pequeño número de muestras analizadas por procedencia, siendo el máximo de 5 en el Limonal, S^{ta}. Olivia, S^{ta}. Rosa, S^{ta}. Teresa y la Picota. El número de muestras en estudios para determinar diversidad genética en poblaciones naturales generalmente se efectúa en poblaciones de más de cien individuos, con un promedio entre 15 y 20 individuos por procedencias o



poblaciones (Bucci y col. 1997; Bartish y col. 2000; De Bustos y col. 1998) y en estudios con menor número de muestras de 6 a 13 por población, estas representan más del 50% del total de números de plantas por población (Nebauer y col. 1999). Sin embargo en los estudios consultados el que presenta el menor número de muestras por población es de 5 muestras en *Gliricidia sepium* aplicando la PCR (Dawson y col. 1994), número que constituye el máximo de muestras en el estudio de la palma pero sólo en 5 procedencias.

En un estudio Nybom y Bartish (2000) concluyen que a pesar de la gran variación en el número de plantas por población (de 10 a 30 plantas) ellos no encontraron ninguna asociación entre este parámetro (Nº. de muestra) con los parámetros de diversidad, hay que señalar que en éste estudio el menor número de muestras es de 10. Otro autor, Bussell (1999) no encontró cambios en la diversidad genética cuando incrementó el tamaño de las muestras de 8 a 14 y 30 plantas en dos poblaciones de *Isotoma petrea*. Sin embargo experimentos de simulación han demostrado que la diversidad entre poblaciones decrece considerablemente de 2 a 5 plantas (similar al número de muestras en este estudio de *Sabal mexicana*) pero se vuelve estable de 10 a 15 plantas (Isabel y col. 1999). Por otro lado Persson y col. (1998) en un estudio de *Lilium martagon* encontraron que la diversidad genética intrapoblacional está positivamente correlacionada con el número de plantas muestreadas (de 4 a 17 plantas muestreadas por población), indicando que tamaños de muestras muy pequeñas podrían ser invalidados.

Generalmente se utilizan menor número de muestras cuando se está analizando un género en particular y se quieren comparar las especies que pertenecen a él, como es el caso de *Lolium* (Stammers y col. 1995). También se analizaron un total de sólo 29 individuos en el estudio sobre la extensión de la variación genética en *Mahoganies* (Chalmers y col. 1994), o bien cuando se estudian poblaciones de una misma especie ubicadas en diferentes países (Gillies



y col 1999) en donde el tamaño de la muestra varía de 4 a 65 individuos analizados por país.

Dado que no se encontró reportado si *Sabal mexicana* es una especie autógena o alógama y debido al bajo número de muestras analizadas en este estudio no se puede suponer que sus poblaciones estén en equilibrio de Hardy-Weinberg, por lo que no se consideró estimar parámetros genéticos como frecuencias alélicas, diversidad génica intrapoblacional etc.

Quizás otro factor que podría estar influyendo en estos resultados (pero en mucha menor medida) es que tan sólo se utilizaron 6 cebadores, los que produjeron 39 marcadores polimórficos, estos podrían resultar pocos para tener resultados concluyentes de la extensión y distribución de la diversidad genética en la palma. Aunque se han reportado trabajos realizados con tan sólo 7 cebadores (Dawson y col. 1994), con 5 cebadores (Chalmers y col. 1994) con 6 cebadores (Nebauer y col. 1999). Sin embargo, la mayoría de los trabajos publicados en los que se utiliza RAPD para análisis poblacionales incluyen un promedio de 10 cebadores (Díaz, 2001). Por ejemplo De Bustos y col. (1998) utilizan 10 cebadores y Cao y col. (1999) 12 cebadores. Aunque en el mismo estudio de Nybom y col (2000) se reporta que no encontraron asociación entre el número de marcadores y los parámetros genéticos, sin embargo recomiendan usar al menos de 50 a 100 marcadores polimórficos (bandas polimórficas). Otros estudios han demostrado la importancia de usar un alto número de marcadores RAPD para obtener estimaciones fiables de distancias genéticas (Spooner y col. 1997; Pejic y col. 1998; Bartish y col. 1999b).

Un tercer factor a considerar en el resultado de este estudio es la posible cantidad de variación genética presente en estas procedencias. Debido a que en general el nivel de diversidad genética de las especies depende de muchos factores, entre ellos el tipo de cruzamiento (González y Sosa, 2002), se realizó



una intensa búsqueda bibliográfica desde internet, textos y en consulta personal a profesores para tratar de determinar el tipo de cruzamiento (autógama o alógama) de *Sabal mexicana*. No se encontró ningún reporte sobre esta información y el Dr. Brunell¹ del Departamento de Ciencias Biológicas de la Universidad del Pacífico que está realizando un estudio con esta especie utilizando el marcador AFLP, nos comunicó que tampoco ha podido obtener esa información, por lo que al parecer no está reportada de forma disponible o no existe. Sin embargo en su estudio (aún no publicado) él ha encontrado poca variación genética en las poblaciones estudiadas por lo que considera que posiblemente la variación sea mucho mayor a través del rango de la especie o que quizás pueda ser autógama o bien por que la población estudiada ha pasado un cuello de botella genético donde la población fue reducida a un número muy pequeño de individuos, originando una reducción de la variabilidad genética entre la descendencia de los pocos sobrevivientes (Audesirk, 2003 y Solomon, 1996).

En general las plantas autógamas presentan menor diversidad genética que las alógamas debido a una gran influencia de la deriva genética. Sin embargo en este estudio de las 42 bandas generadas por los 6 cebadores, 39 son polimórficos en el total de muestras analizadas, es decir, un 92.8%, lo que nos indica la gran cantidad de polimorfismo presente en estas procedencias y la efectividad de los marcadores RAPD en detectar variación genética, puesto que con esta técnica se amplifican principalmente regiones del ADN no codificantes y repetidas que constituyen la mayor parte del genoma de los eucariotas (Díaz, 2001) en las cuales las tasas de sustitución nucleotídica son el doble que en las regiones codificantes (Nei, 1987).

La distribución de las diferentes muestras por procedencia en el dendrograma parece indicar que hubiera poca diferenciación entre las distintas

¹Brunell. 2005. Diversidad Genética de *Sabal mexicana* con marcadores RAPD (correo electrónico). University of Pacific, Estados Unidos.



procedencias ya que algunas muy distantes geográficamente se agrupan más cercanamente, esto probablemente sea debido a que la mayor variación genética esté dentro de las procedencias más que entre procedencias. Resultados similares se han reportado en diversos estudios utilizando RAPD, por ejemplo en la palmera canaria (*Phoenix canariensis*) con reproducción cruzada, en la que el 75.9% de la diversidad genética se encuentra dentro de las poblaciones y tan solo el 24.1% entre poblaciones (González y Sosa, 2002). En *Licuala glabra* (Palmae) la partición de la varianza molecular usando AMOVA revela que la mayoría de la varianza total puede ser atribuida a la variación dentro de las poblaciones (68.4%) comparada con un 31.5% de diferenciación entre poblaciones (Loo y col. 1999). Resultados similares se obtienen también en otras especies alógamas con diferentes tipos de marcadores por ejemplo con isoenzimas (Hamrick y Godt, 1989).

Estos resultados preliminares obtenidos con las procedencias de *Sabal mexicana*, (sin realizar estimaciones de frecuencias alélicas) sugieren que esta especie pudiera ser alógama, ya que la reproducción cruzada genera mayor diversidad genética intrapoblacional (González, 2002). Sin embargo se requeriría hacer un estudio de polinización manual controlada o con marcadores alozímicos para determinarlo de forma definitiva. Tampoco contamos con un estudio de variabilidad morfológica ni en estas ni en otras poblaciones de *Sabal mexicana* presentes en nuestro país que nos permitiera comparar los dos tipos de marcadores.



Conclusiones



Los resultados obtenidos en este estudio preliminar de la diversidad genética presente en procedencias de *Sabal mexicana* utilizando el marcador RAPD permite hacer las siguientes conclusiones:

1. El marcador RAPD es muy eficiente en la detección de la variabilidad genética en *Sabal mexicana* puesto que de 42 marcadores moleculares generados, 39 resultaron polimórficos, lo que corresponde a un 92.8%.
2. En general las procedencias con mayor número de muestras (5) son las que presentaron mayor porcentaje de polimorfismo con los 6 cebadores, destacándose entre ellas el Limonal (91.11%), S^{ta}. Rosa (86.60%) y S^{ta}. Teresa (70.98%). Los cebadores más productivos en generar polimorfismo en las procedencias fueron el N-09 (75%), AE-16 y E-12 (ambos con 72%).
3. El agrupamiento de las muestras con un bajo porcentaje de similitud genética (20%) indica una alta diversidad genética ellas, pero no las relaciona por procedencias ya que de manera general muestras de una misma procedencia se disgregan a través del dendrograma relacionándose con muestras de otras procedencias (e inclusive de localidades geográficas distantes) y solo algunas de ellas presentan una tendencia a mantenerse cercanas entre sí (4 muestras de El Limonal y S^{ta}. Olivia y 2 muestras de S^{ta}. Rosa, S^{ta}. Teresa, Kilaca, Las Lajitas y el Cortezal).
4. El hecho que no se hayan generado agrupamientos de acuerdo a las localidades geográficas de las distintas procedencias podría revelar que no existe mucha diferencia genética entre las procedencias, por lo que la mayor parte de la diversidad genética estaría dentro de las procedencias.



Recomendaciones



Los resultados obtenidos en este estudio preliminar en *Sabal mexicana* permiten hacer las siguientes recomendaciones:

1. - Para obtener resultados más concluyentes de la diversidad genética presente en las procedencias de *Sabal mexicana*, se requeriría aumentar tanto el número de muestras por procedencias, como el número de cebadores para obtener mayor cantidad de marcadores moleculares (bandas polimórficas) y poder realizar estimaciones de sus frecuencias génicas.

2. - Es necesario realizar estudios adicionales en esta importante especie. Uno para determinar el tipo de cruzamiento (autógama o alógama), el cual se puede realizar por medio de polinización manual controlada y otro estudio de caracterización morfológica. Esta información permitiría orientar acerca del nivel de diversidad genética presente en la especie y contrastarla con los resultados obtenidos en este estudio.



Bibliografía



1. Apostol, B. L.; Black, W. C.; Reiter, P.; Miller, B. R. 1996. Population genetics with RAPD – PCR markers: the breeding structure of *Aedes aegypti* in Puerto Rico. *Heredity*, 76:325 – 334.
2. Audesirk, T.; Audesirk, G.; Byers, B. 2003. Biología. La vida en la tierra. 6^{ta}. Edición, Mexico. *Evolución de los organismos*, p 292.
3. Arc view 3.2. 1996. The Geographic Information System for Everyone. (GIS). U.S.A.
4. Armas, R. C. y Canales, M. J. 2003. Ecología y distribución de *Sabal mexicana* Mart en el Pacífico norte de Nicaragua. (2002-2003). Tesis Lic. Biol. León – Nicaragua. UNAN-LEON. 61p.
5. Arnholdt – Schmitt, B. 2000. RAPD analysis: a method to investigate aspects of the reproductive biology of *Hypericum perforatum* L. *Theor. Appl. Genet.* 100: 906 – 911.
6. Aruana, M.; Ozias – Akins, P.; Austin, M. E.; Kochert, G. 1993. Genetic relatedness among rabbiteye blue berry (*Vaccinium ashei*) cultivars determined by DNA amplification using single primers of arbitrary sequence. *Genome*, 36: 971 – 977.
7. Bartish, I. V.; Garkava, L. P.; Rumpunen, K.; Nybom, H. 2000. Phylogenetic relationships and differentiation among and within populations of *Chaenomeles* Lind l. (*Rosaceae*) estimated with RAPDs and isozymes. *Theor. Appl. Genet.* 101: 554 – 563.



8. Bartish, I. V.; Jeppsson, N.; Nybom, H. 1999. Population genetic structure in the dioecious pioneer plant species *Hippophae rhamnoides* investigated by Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) markers. *Mol. Ecol.* 8: 791 – 802.
9. Beaumont, V. H.; Mantet, J.; Rocheford, T. R. 1996. Comparison of RAPD and RFLP markers for mapping F₂ generations in maize (*Zea mays* L.). *Theor. Appl. Genet.* 93: 606 – 612.
10. Bucci, G.; Vendramin, G. G.; Lelli, L.; Vicario, F. 1997. Assessing the genetic divergence of *Pinus leucodermis* Ant. Endangered populations: use of molecular markers for conservation purposes. *Theor. Appl. Genet.* 95: 1138 – 1146.
11. Bussell, J. D. 1999. The distribution of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) diversity among populations of *Isotoma petraea* (*Lobeliaceae*). *Mol. Ecol.* 8: 775 – 789.
12. Cao, W.; Scoles, G.; Hucl, P.; Chibbar, R. N. 1999. The use of RAPD analysis to classify *Triticum* accessions. *Theor. Appl. Genet.* 98: 602 – 607.
13. Chalmers, K. J.; Newton, A. C.; Waugh, R.; Wilson J and Powell, W. 1994. Evaluation of the extent of genetic variation in *Mahoganies* (*Meliaceae*) using RAPD markers. *Theor. Appl. Genet.* 89: 504 – 508.
14. CONABIO. 2000. El uso y manejo tradicional de la palma del guano en el área maya de Yucatán, (en línea). Consultado 02 Abr 03. Disponible en <http://www.cendoc@xolo.conabio.gob.mx> 6p.
15. Cronquist, A. 1988. The evaluation and classification of flowering plants, second edition, the, New York Botanical Garden Bronx, New York, U.S.A. p 77.



16. Curtis, H.; Barnes, N. 2000. Biología. Sexta Edición en Español. Schnek, A.; Flores, G. Madrid, España. Editorial Medica Panamericana. *Evolución: Variabilidad Genética.*, p 574.
17. Dávila, M. I. 2003. Proyecto dinámica ecológica del bosque seco y fomento del cultivo de la palma paceña (*Sabal mexicana* Mart) en el occidente de Nicaragua. (PROFOR, UNAN-LEON). Subcomponente, variabilidad genética a nivel proteico, (*informe técnico*), León- Nicaragua, 12p.
18. Dawson, K.; Simons, A. J.; Waugh, R and Powell, W. 1994. Diversity and genetic differentiation among subpopulations of *Gliricidia sepium* revealed by PCR-based assays. p10 – 18.
19. De Bustos, A.; Casanova, C.; Soler, C. and Jouve, N. 1998. RAPD variation in wild populations of four species of the genus *Hordeum* (Poaceae). *Theor. Appl. Genet.* 96: 101 – 111.
20. De Greef, B.; Triest, L.; de Cuyper, B. and van Slyckens, J. 1998. Assesment of intraespecific variation in half – sibs of *Quercus petra* (Matt.) Liebl. Plus trees. *Heredity*, 81: 284 – 290.
21. Devos, K. M and Gale, M. D. 1992. The use of random amplified polymorphic DNA markers in wheat. p567 – 572.
22. Díaz V, M. V. 2001. Caracterización de la diversidad genética de poblaciones naturales de *Pinus oocarpa* de Nicaragua a través de marcadores moleculares. Tesis doctoral, Alcalá de Henares, España, universidad de Alcalá de Henares, España. 127 p.



23. FAO. 1993. Ordenación y conservación de los bosques densos de América tropical Estudio FAO Montes., pp. 101.
24. Farjon, A. and Styles, B. T. 1997. *Pinus* (Pinaceae). In: Flora Neotropica Monograph N°. 75. New York Botanical Garden. New York.
25. Fontdevila. A y Moya. A. 1999. Introducción a la genética de poblaciones. Madrid – España. Editorial Síntesis S.A. 349 p.
26. Frankham, R.; Ballou, J. D and Briscoe, D. A. 2002. Introduction to Conservation Genetics. Cambridge University Press. U.S.A. 617p.
27. Gallego, P. R. 1994. Análisis de variabilidad genética del centeno (*Secale sereale*) utilizando marcadores bioquímicos y moleculares Tesis Msc. Alcalá de Henares, España. Universidad de Alcalá de Henares. 63 p.
28. García – Mas, J.; Oliver, M.; Gomes – Paniagua, H. y de Vicente, M. C. 2000. Comparing AFLP, RAPD and RFLP markers for measuring genetic diversity in melon. *Theor. Appl. Genet.* 101: 860 – 864.
29. Gillies, C. M.; Navarro, C.; Lowe, A. J.; Newton, A. C.; Hernandez, M.; Wilson, J and Cornelius, J. P. 1999. Genetic diversity in Mesoamerican populations of mahogany (*Swietenia macrophylla*), assessed using RAPDs. p722 – 732.
30. González P, M. A y Sosa H, P. 2002. La Palmera Canaria (*Phoenix canariensis*): Diversidad Genética e Hibridación (en línea). Gran Canaria, España. Consultado 26 enero 2005. Disponible en <http://www.gobcan.rs/medioambiente/revista/2002/23/-11k>.



31. Hamrick, J. L. 1994. Genetic diversity and conservation in tropical forest. In: Drysdale, R. M., John, S. E. T. and Yapa, A. C. (eds) *Proceedings of the international Symposium on Genetic Conservation and Production of Tropical ASEAN – Canada Forest Tree Seed Centre Project*, Muak – Saraburi, Thailand. *Fprest Tree Seed*, pp. 1 – 9.
32. Hamrick, J. L.; Godt, M. J. W. 1989. Allozyme diversity in plant species. En: plant population genetics, breeding and genetic resources (Editado por A.H.D. Brown, M. T. Clegg, A.L. Kahler, B.S. Weir,). Sinauer Assoc Sunderland. Mass., pp 43 – 63.
33. Hogbin, P. M. and Peakall, R. 1999. Evaluation of the Contribution of Genetic Research to the Management of the Endangered Plant *Zieria prostrata*. Australian National University, Australia, *Conservation Biology*, pp. 514 – 522.
34. INETER. 1988. León, 1^{ra} ed, Nicaragua, 1:50000 Esc, 2852 – IV pg, Color, Serie actualizada en 1986 con levantado aéreo de 1986 en compilado de 1956. Región II Dpto. de León.
35. Isabel, N.; Beaulieu, J. and Bousquet, J. 1995. Complete congruence between gene diversity estimates derived from genotypic data at enzyme and Random Amplified Polymorphic DNA loci in black spruce. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 92: 6369 – 6373.
36. Isabel, N.; Beaulieu, J.; Thériault, P. and Bousquet, J. 1999. Direct evidence for biased gene diversity estimates from dominant Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) fingerprints. *Mol. Ecol*. 8: 477 – 483.



37. Jones, L. 1994. palms throughout the world, 1^{ra} edition, Smithsonian institution press, Washington, p26.
38. Lemhann, P. F.; Lin, D. and Lasker, B. 1992. Genotypic Identification and Characterization of Species and Strains within the Genus *Candida* by Using Random Amplified Polymorphic DNA. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol. 30, N°. 12, pp. 3249 – 3254.
39. Loo, A. H.; Tan B, H. W.; Kumar P, P and Saw, L. G. 1999. Population Analysis of *Licuala glabra* Griff. Var, *glabra* (*Palmae*) using RAPD Profiling. *Annals of Botany*, p 421 – 427.
40. Lynch, M. and Milligan, B. G. 1994. Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Mol. Ecol.* 3: 91 – 99.
41. Maniatis, T. A.; Frisch, E. F. and Sambrook, J. 1982. Molecular cloning:a laboratory manual. Cold Spring Harbor, New York, U.S.A. *Agarose Gel Electroforesis*. 5: 150 – 172.
42. Martínez, C. P. y Tohme, J. 2001. IV Encuentro Latinoamericano de biotecnología Vegetal del 4 al 8 de Junio del 2001. Progress in the genetic improvement supported by molecular markers. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Goias – Brasil. Produccion: WWW.Bioplanet.net. CD – ROM.
43. Möller, E. M.; Bahnweg, G.; Sandermann, H and Geiger, H. H. 1992. A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous *fungi*, fruit, bodies, and infected plant tissues. *Nucleic Acid Research* 20: 6115 – 6116.



44. Molnar, S. J; James, L. E and Kasha K, J. 1999. Inheritance and RAPD tagging of multiple genes for resistance to net blotch in barley. *Genome*, 43: 224 – 231.
45. Nebauer, S. G.; del Castillo – Agudo, L. and Segura, J. 1999. RAPD variation within and among natural populations of outcrossing willow – leaved foxglove (*Digitalis obscura* L.) *Theor. Appl. Genet.* 98: 985 – 994.
46. Nei, M. 1987. Molecular evolutionary genetics. Columbia University Press, New York.
47. Nesbitt By, K. A.; Potts, B. M.; Vaillancourt, R. E and Reid, J. B. 1996. Fingerprinting and pedigree analysis in *Eucalyptus globulus* using RAPD. p6 – 11.
48. Nybom Hilde and Bartish, Igor V. 2000. Effects of life history traits and sampling strategies on genetic diversity estimates obtained with RAPD markers in plants. Vol. 3/2, pp. 93 – 114.
49. Paguaga, R. D. 2000. Plantas de la ciudad de león y sus usos, tesis Lic. León – Nicaragua. UNAN-LEON, p29.
50. Pejic, I.; Ajmone – Marsan, P.; Morgante, M.; kozumplick, V.; Castiglioni, P.; Taramino, G and Motto, M. 1998. Comparative analysis of genetic similarity among maize inbred lines detected by RFLPs, RAPDs, SSRs, and AFLPs. *Theoretical and Applied Genetics*, 97, 1248 – 1255.
51. Persson, H. A.; Lundquist, K and Nybom, H. 1998. RAPD analysis of genetic variation within and among populations of Turk's – cap lily (*Lilium martagon* L.). *Hereditas*, 128, 213 – 220.



52. Picado, L. C. 1997. Evaluación de las relaciones genéticas entre y dentro de cuatro cultivares importados de *Jatropha curcas* L, establecidas en el banco de germoplasma de la UNAN – León, tesis Lic. León – Nicaragua. UNAN-LEON, 51p.
53. Puertas, M. J. 1999. Genética, Fundamentos y Perspectivas, 2^{da} edición, Madrid – España, McGRAW-HILL – INTERAMERICANA, *Genética de poblaciones*, p 695.
54. Ramos, M y Quezada, V. 1980. Reconocimiento sobre el estado actual de los palmares de la región II, INAFOR, departamento de dendrología, Managua, Nicaragua, p33 - 77.
55. Rasmussen, S. F. 1994. Conservación y aprovechamiento racional de *Pinus patula* ssp. *tecunumanii* en Yucul. Pinos de Nicaragua. (Editado por el Ministerio del Medio Ambiente y Recursos Naturales y DANIDA). pp 28 – 41.
56. Rieseberg, L. 1996. Homology among RAPD fragments in interspecific comparisons. *Mol. Ecol.* 5: 99 – 105.
57. Rohlf, F. J. 1993. NTSYS – pc: Numerical taxonomy and multivariate analysis system. Version 1.80. Exeter Software. New York.
58. Salas Estrada, J. 1993. Árboles de Nicaragua, editorial Hispamer, Managua – Nicaragua, p 12 – 99.
59. Salas, J. 2002. Biogeografía de Nicaragua, 1^{ra} edición, INAFOR, Managua – Nicaragua, p 26 – 41.



60. SEMARNAT. 1997. Especies con uso no maderable en bosques tropicales y subtropicales en los estados de Durango, Chihuahua, Jalisco, Michoacán, Guerrero, y Oaxaca. México, consultado el 02 Abr 03. Disponible en <http://www.semarnat.gob.mx/pfmn> , p 3 - 3.
61. Sheri, P. K.; Cannon, R. E. and Scandalios, J. G. 1993. Concentration of Primer and Tenplate Qualitatively Affects Products in Random – Amplified Polymorphic DNA PCR. Department of Genetics, Box 7614 North Carolina State University BioFeedback Raleigh, NC 27695 – 7614. Vol. 14. N°. 3. *BioTechniques*, pp. 362 – 364.
62. Soliman, S. S.; Ali, B. A. and Morsy, M. M. 2003. Genetic comparisons of Egyptian date palm cultivars (*Phoenix dactylifera* L.) by RAPD – PCR. *African Journal of Biotechnology*, Vol. 2(4), pp. 86 - 87
63. Solomon, E. P.; Berg, L. R.; Martín, D. W. y Villee, C. 1996. Biología de Villee 3^{ra} ed, México. Editorial interamericana, Mc Graw – Hill. *Genetica de poblaciones*, p 386 – 387.
64. Spooner, D. M.; Ugarte, M. L. and Skroch, P. W. 1997. Species boundaries and interrelationships of two closely related sympatric diploid wild potato species, *Solanum astleyi* and *S. Bolivense*, based on RAPDs. *Theoretical and Applied Genetics*, 95, 764 – 771.
65. Stammers, M.; Harris, J.; Evans, G. M.; Hayward, M. D and Forster, J. W. 1995. Use of random PCR (RAPD) technology to analyse phylogenetic relationships in the *Lolium / Festuca* complex. *Heredity*. 74: 19 – 17.
66. Stevens, W. D.; Ulloa U, C. C.; Pool, Amy y Montiel, Olga M. 2001. Flora de Nicaragua. Botanical monograf of the BBG. N°82, tomo 1, 1^{ra} edición, Estados



- Unidos, editorial Missouri Botanical Garden Press. *Arecaceae* p 192 – 194.
Sabal p226.
67. Subramanian, V.; Gurtu, S.; Nageswara, R. C and Nigam, S. N. 2000. Identification of DNA polymorphism in cultivated groundnut using random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay. *Genome*, 43: 656 – 600.
68. Tingey, S. V. and del Tufo, J. P. 1993. Genetic Analysis with Random Amplified Polymorphic DNA Markers. *Plant Physiol.* 101: 349 – 352.
69. Watson, J. D.; Gilman, M.; Witkowski, J. and Zoller, M. 1991. Recombinant DNA; 2^{da}, ed., Scientific American Books, U.S.A. 619 p.
70. Williams G, L. A y Ramos R, E. D. 2000. Uso de marcadores RAPD_s (Random Amplified Polymorphic DNA) para evaluar la variabilidad genética en 7 cultivares de *Jatropha curcas* L. tesis Lic. León – Nicaragua. UNAN – LEON. 61p.
71. Williams J, G. K.; Kubelik, A. R.; Livak, K. J.; Rafalski, J. A. and Tingey, S. V. 1990. DNA Polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic. Acids. Res.* 18: 6521 – 6535.
72. Wu, J.; Krutovskii, K. and Strauss, S. H. 1999. Nuclear DNA diversity. Population differentiation and phylogenetic relationships in the California close – cone pines based on RAPD and allozyme markers. *Genome*, 42: 893 – 908.



ANEXOS



Tabla 2. Distribución geográfica de las procedencias (donde fueron colectadas las muestras de *S. mexicana* suministradas por el proyecto Dinámica Ecológica del Bosque Seco y Fomento del Cultivo de la Palma Paceaña en el Pacífico de Nicaragua. (INETER, 1998).

Código	procedencias	municipios	Dpto.	Latitudes	Longitudes
PTS	Los Patos	Telica	León	12°26'30"	87°26'32"
LJ	Las Lajitas	La Paz Centro	León	12°18'30"	86°40'32"
RO	Santa Rosa	Abangasca	León	12°27'10"	86°54'20"
LI	El Limonal	P. Morazán	Chinandega	12°51'30"	87°12'10"
PI	La Picota	El Viejo	Chinandega	12°40'23"	87°20'24"
NE	R. los Negritos	Momotombo	León	12°26'00"	86°32'54"
TR	Santa Teresa	El Tintal	Chinandega	12°47'30"	87°27'40"
OL	Santa Olivia	La Paz Centro	León	12°19'50"	86°40'52"
AC	Aguas Caliente	La Paz Centro	León	12°26'45"	86°36'27"
KL	Kilaca	El Viejo	Chinandega	12°49'50"	87°29'00"
PP	El Papalonal	Mina el Limón	León	12°28'20"	86°27'58"
CT	El Cortezal	Mina el Limón	León	12°26'20"	86°27'42"
CC	La Concepción	L. Concepción	Masaya	14°26'25"	86°50'32"
NGT	Nagarote	Nagarote	León	12°14'40"	86°32'20"
MUN	Muna	Cinco Pino	Chinandega	13°13'40"	86°51'50"
PAL	Los Palmares	Momotombo	León	12°26'17"	86°30'28"



Figura 1. Mapa de ubicación geográfica de las procedencias (donde fueron colectadas las muestras de *S. mexicana*, suministradas por el proyecto Dinámica Ecológica del Bosque Seco y Fomento del Cultivo de la Palma Paceaña), en el occidente Nicaragüense (INETER. 1998, Arc view 3.2. 1996).

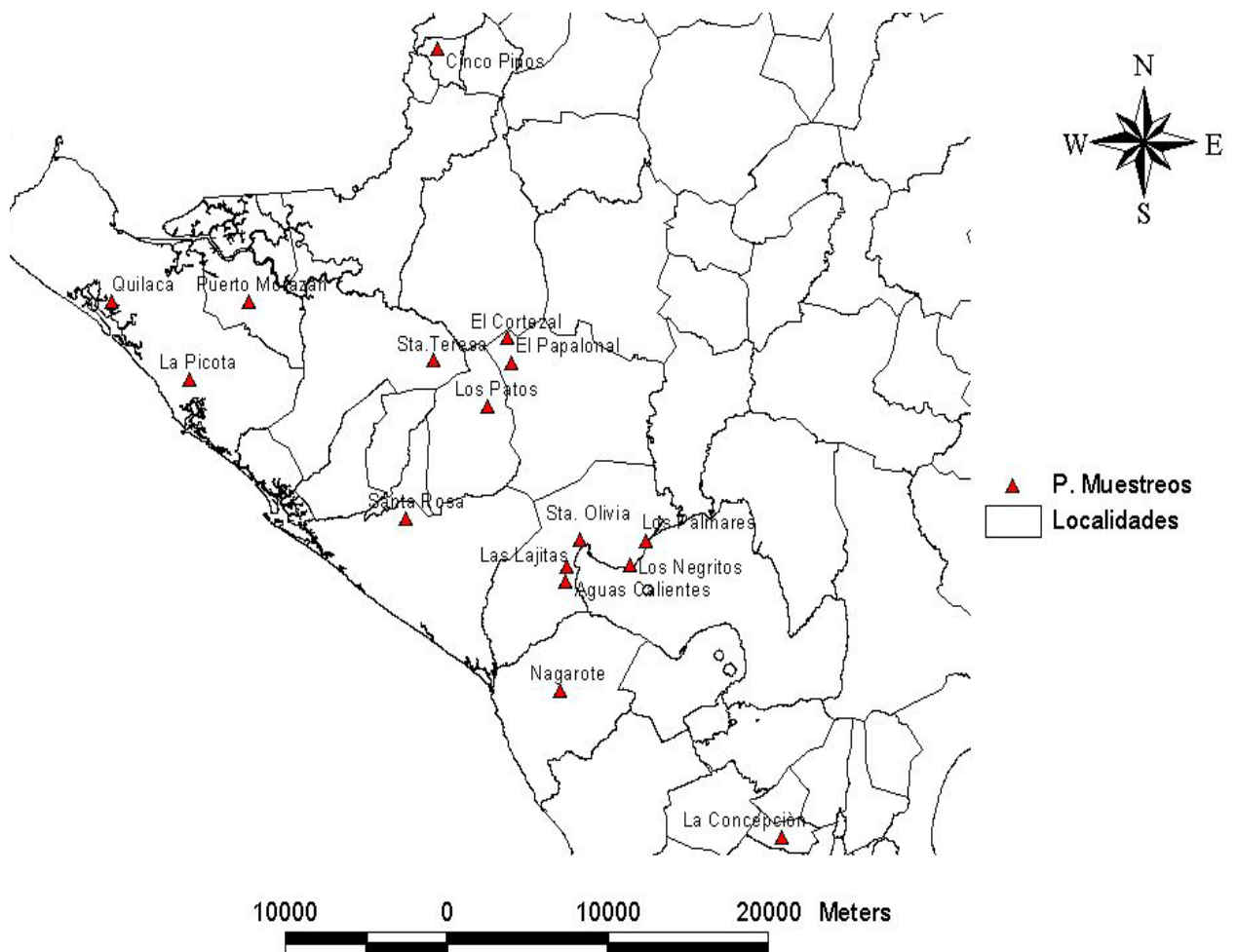




Tabla 4. Matriz de presencia – ausencia de Marcadores RAPDs, detectados con 6 cebadores. Se utilizaron 48 muestras de *Sabal mexicana* Mart obtenidas de 16 sitios de procedencia ubicados en el Pacífico de Nicaragua.

Código Nº / Sitios	Marcadores RAPDs / Cebador																																															
	N-09	AE-16				N-12			E-12	A-04		E-19																																				
PTS	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1								
1. TJ1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1								
2. TJ2	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1								
3. TJ3	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1									
4. RO1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1									
5. RO2	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1								
6. RO3	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1								
7. RO4	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1								
8. RO5	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1						
9. LI1	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0							
10. LI2	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1							
11. LI3	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1						
12. LI4	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1						
13. LI5	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1						
14. PI1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1							
15. PI2	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1						
16. PI3	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1						
17. PI4	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	1						
18. PI5	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1				
19. NE1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1				
20. NE2	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1			
21. TE1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0		
22. TE2	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1				
23. TE3	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1				
24. TE4	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	1	0	1	
25. TE5	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0			
26. OL1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	
27. OL2	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1		
28. OL3	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	
29. OL4	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1
30. OL5	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1

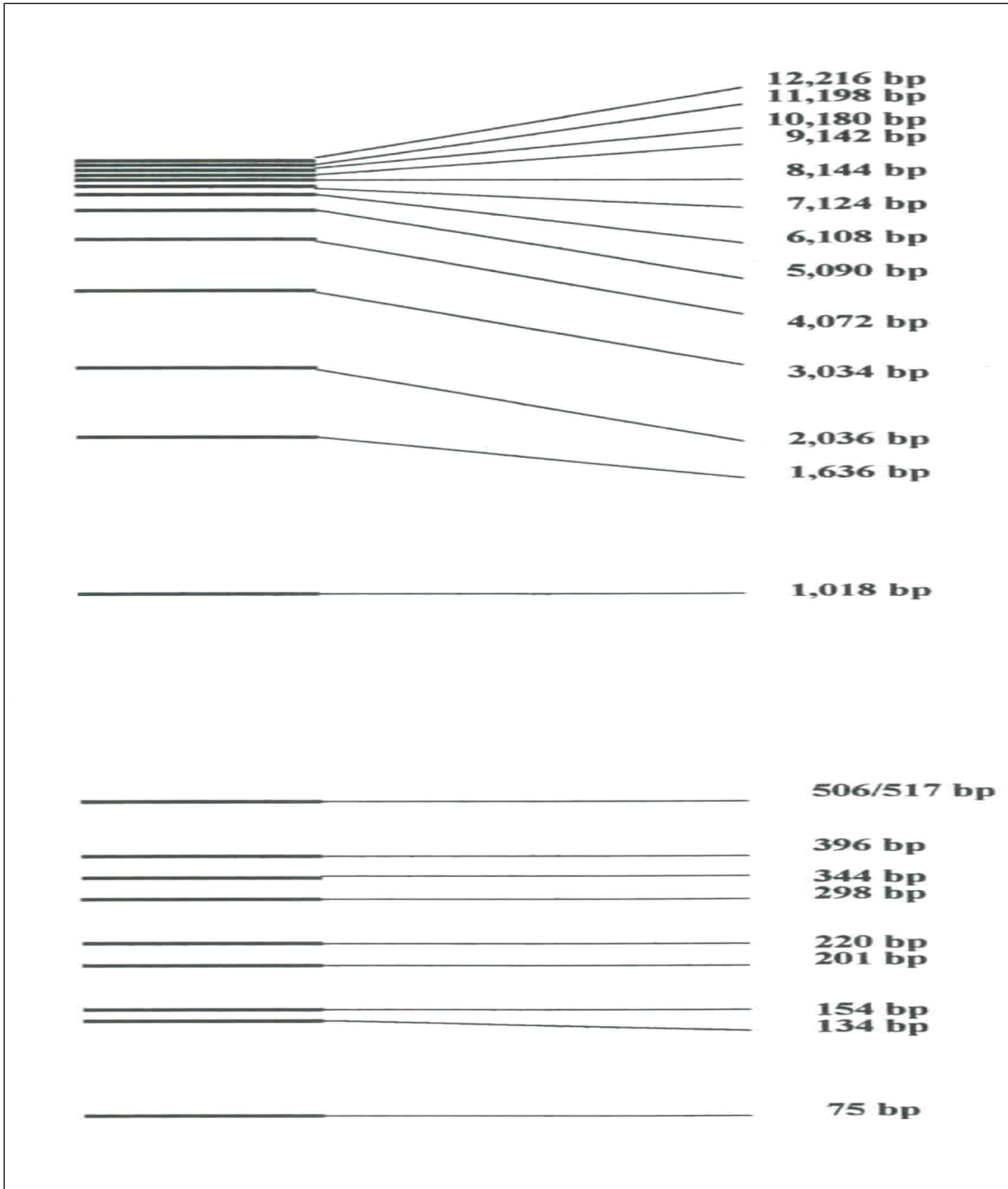


Tabla 4. Continuación

Código N° / Sitios	Marcadores RAPDs / Cebador																																																			
	N-09	AE-16				N-12				E-12	A-04		E-19																																							
32. AC1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1													
33. AC2	1	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1												
34. KL1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0												
35. KL2	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0										
36. KL3	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1											
37. KL4	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0					
38. PP1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0						
39. PP2	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1					
40. PP3	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1				
41. PP4	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1		
42. CT1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1					
43. CT2	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1		
44. CC1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	
45. CC2	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1
46. NGT	1	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	
47. MUN	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
48. PAL	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1



Figura 2. Marcador de ADN Ladder (GIBCO,BRL) usado para determinar en el gel de agarosa la posición y el peso molecular de los fragmentos del ADN de *Sabal mexicana* Mart, amplificados con la técnica RAPD.



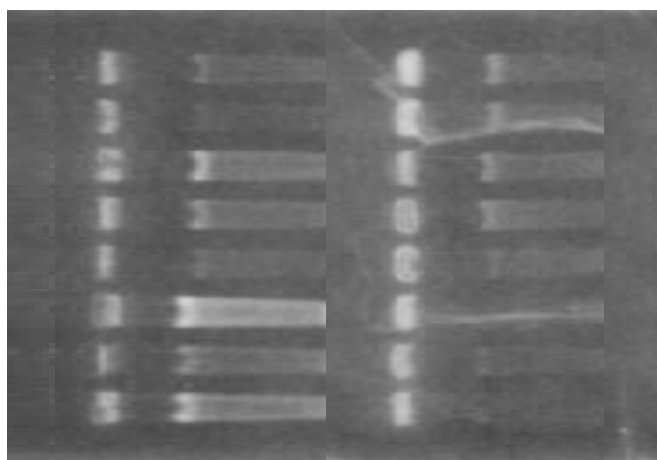


Foto 7. Resultados del chequeo de ADN, extraído de 16 muestras de *Sabal mexicana* Mart.

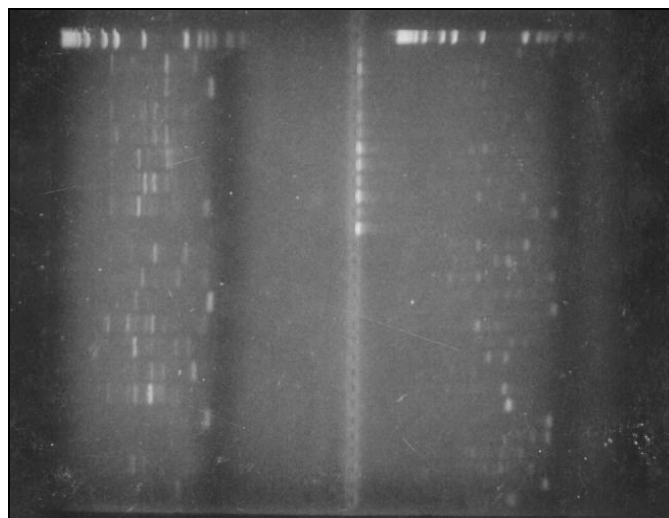


Foto 8. Patrón de bandas de ADN generados con el cebador (AE – 16) ensayado con el total de muestras (48) de *Sabal mexicana* Mart, luego de la amplificación por medio de la técnica RAPD.



Figura 3. Patrones de Bandas de ADN generados con los cebadores N-09 y AE-16.

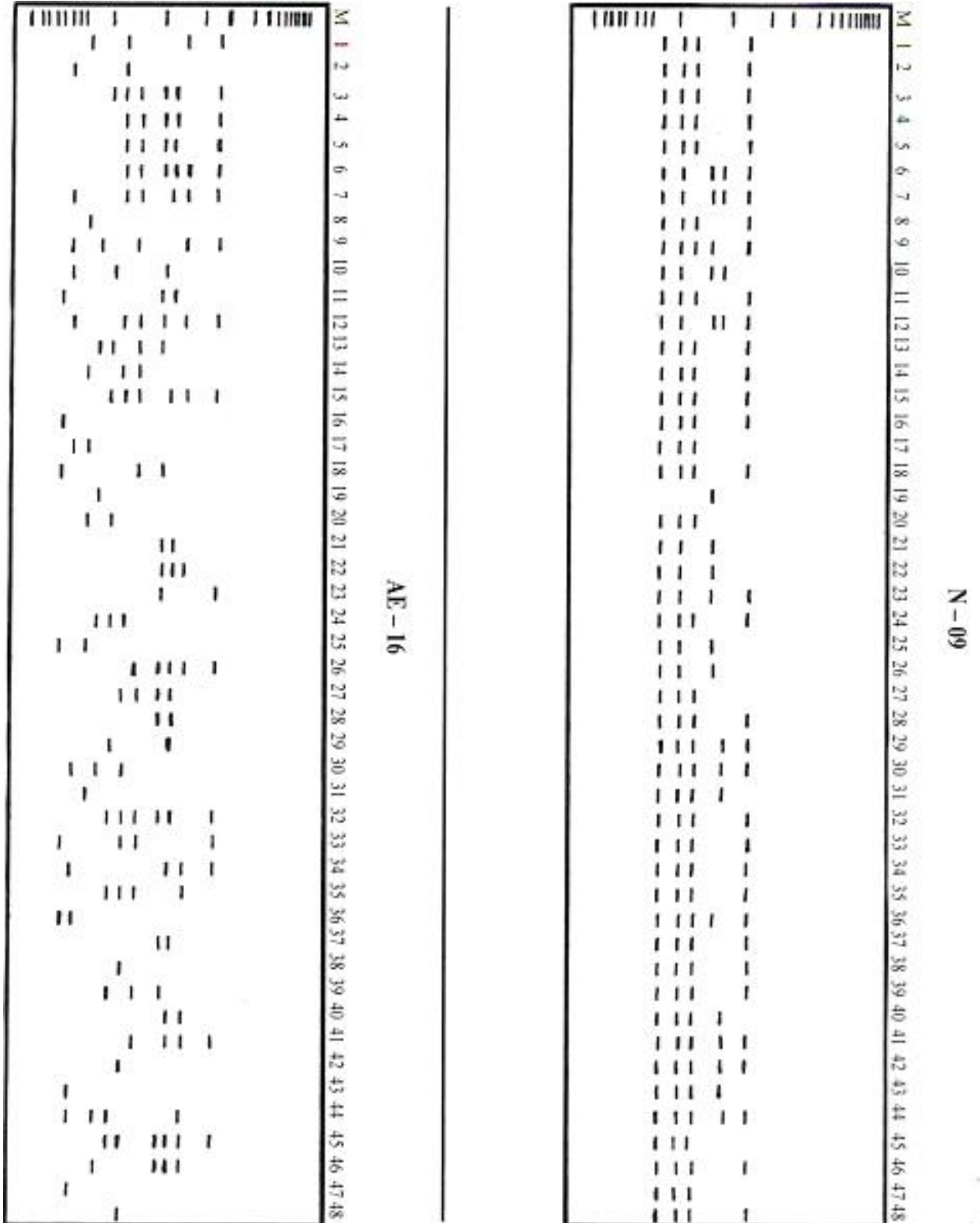




Figura 4. Patrones de Bandas de ADN generados con los cebadores A – 04 y E – 19.

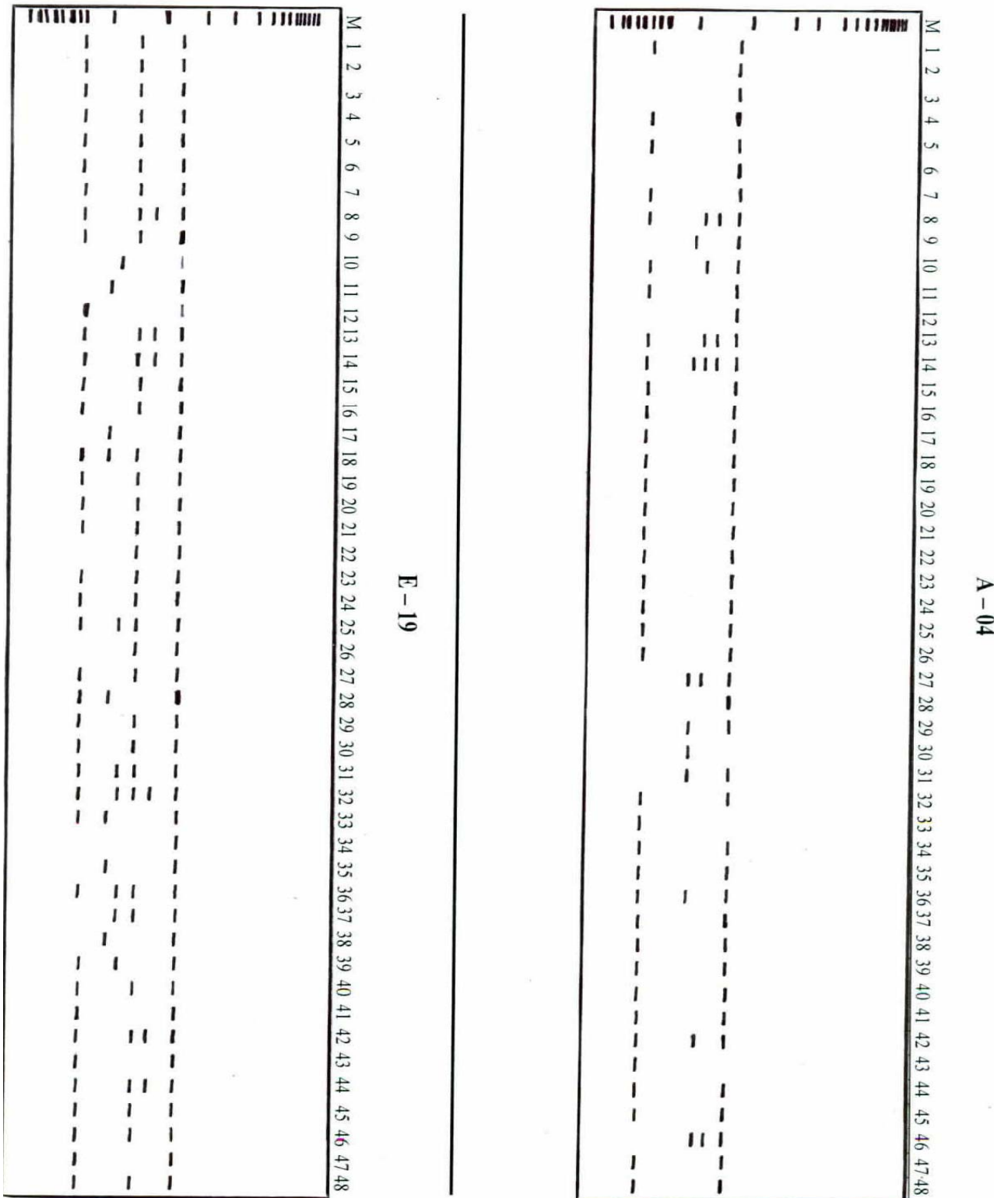




Figura 5. Patrones de Bandas de ADN generados con los cebadores N – 12 y E – 12.

