

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE
GUATEMALA
Facultad de Ciencias y Humanidades
Departamento de Bioquímica y
Microbiología

Estudio genético de una población de
cocoteros altos (*Cocos nucifera L.*) en el
puerto de Ocós, San Marcos, mediante
secuencias microsatélites

Mishel Marie Stephenson Ojea

Guatemala
2006

Estudio genético de una población de cocoteros altos (*Cocos nucifera L.*) en el puerto de Ocós, San Marcos, mediante secuencias microsátélites

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE
GUATEMALA
Facultad de Ciencias y Humanidades
Departamento de Bioquímica y
Microbiología

Estudio genético de una población de
cocoteros altos (*Cocos nucifera L.*) en el
puerto de Ocós, San Marcos, mediante
secuencias microsatélites

Trabajo de investigación presentado por Mishel
Stephenson para optar al grado de Licenciado en
Bioquímica y Microbiología

Guatemala
2006

PREFACIO

Nuestro país posee un inmenso patrimonio natural, caracterizado por su alta diversidad biológica y eco-sistémica, y es nuestro deber como científicos contribuir al mantenimiento del capital natural de los guatemaltecos. Entre los numerosos recursos con los que contamos se encuentran los cocoteros, que poseen no sólo una gran importancia cultural sino un alto potencial económico, sin embargo, su cultivo ha sido limitado en parte por el desconocimiento de su manejo y recientemente por enfermedades que lo atacan. Muchos de nuestros cocoteros del área del Atlántico han sido devastados por el Amarillamiento Letal del Cocotero por lo que se ha iniciado un programa formal de replantación en las zonas afectadas. Como parte de dicho programa se presenta la siguiente investigación, que tiene por objetivo la caracterización de una de las poblaciones de cocoteros que existen en el país y que podría ser utilizada para pruebas de resistencia al ALC en el Atlántico.

Agradezco a todo el equipo involucrado en el desarrollo de esta investigación: Al laboratorio de Protección Vegetal en la Universidad del Valle de Guatemala, al financiamiento otorgado por el Concyt al proyecto AGROCYT-063-2004 "Caracterización molecular y fenotípica de variedades altas de cocoteros (*Cocos nucifera L.*) en la costa sur de Guatemala", y al apoyo brindado por el Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY).

Dedico esta investigación a mis padres y hermanos, gracias por lucha, su apoyo incondicional y por toda su paciencia y cariño

A Alvaro, gracias por tu amor, apoyo, paciencia y ayuda.

A mis grandes amigos Luis, Fredy, Fernando, Laura, Lucía y Melany, gracias por su incansable ayuda y paciencia y por su sincera amistad.

A todos mis maestros, guías y asesores en especial a: Lda. Margarita Palmieri, Lic. Fredy Mejía y José Héctor Aguilar, PhD, gracias por todo el tiempo y energías invertidos.

A todos los que no menciono, pero que han formado parte de mi vida, muchas gracias.

ÍNDICE

	Pág
PREFACIO	iv
LISTA DE CUADROS	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
RESUMEN	ix
I. INTRODUCCIÓN	1
A. Antecedentes	2
1. El cocotero (<i>Cocos nucifera</i> L.)	2
a. Descripción	2
1) Hojas	3
2) Flores	3
3) Frutos	3
4) Desarrollo	5
b. Variedades de cocoteros	5
c. Hábitat	6
d. Breve historia del cocotero	6
e. Importancia económica en Guatemala	7
f. Amarillamiento letal del cocotero	8
1) Generalidades	8
2) Historia del amarillamiento letal del cocotero en el Caribe	8
3) Sintomatología	9
4). Control de la enfermedad	11
3. Genética de poblaciones	12
a. Poblaciones naturales	12
b. Variación genética	13
1) Equilibrio de Hardy-Weinberg y los factores que afectan la variación	13
2) Métodos utilizados para el estudio de variación genética	15
a) Marcadores moleculares	15
b) Microsatélites	18
c) Características de los microsatélites	19
d) Clasificación de los microsatélites	20
e) Limitaciones de los microsatélites	21
f) Iniciadores utilizados para amplificar	21
3) Importancia de las pruebas moleculares	21
4) Suposiciones necesarias para medir la variación genética entre poblaciones usando datos de microsatélites	23
B. Justificación	23
C. Objetivos	24

D. Hipótesis	25
II. MATERIALES Y MÉTODOS	26
A. Colección de muestras de tejido foliar de cocoteros	26
B. Esquema general de la metodología	27
C. Extracción de ADN	28
D. Cuantificación y dilución de ADN	28
E. Reacción en cadena de la polimerasa (“PCR”)	29
F. Electroforesis en gel de agarosa	30
G. Electroforesis en gel de secuenciación	31
H. Lectura del gel de secuenciación	34
I. Análisis de datos	35
III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	36
IV. CONCLUSIONES	49
V. RECOMENDACIONES	50
VI. LITERATURA CITADA	51
VII. ANEXOS	55
A. Fotografías de los geles de secuenciación de todas las secuencias microsatélites	55
B. Tamaño de alelos para las catorce secuencias microsatélites	63
C. Gráficas de las frecuencias de alelos obtenidos para la población “Maravillas”	65
D. Glosario	70

LISTA DE CUADROS

Cuadro		Pág
1	Volumen y valor de las exportaciones de coco a El Salvador registrados en la ventanilla de exportaciones	7
2	Tipos y ejemplos de microsatélites	20
3	Nombres, secuencias y temperatura de fusión de iniciadores a utilizarse para las secuencias microsatélites	22
4	Programa para PCR utilizado para la amplificación de las secuencias microsatélites	30
5	Absorbancias a 260, 280 y 320 nm, razón A260/A280 y concentración de muestras obtenidas a partir del método de extracción de ADN	36
6	Programas de PCR base utilizados para la optimización	38
7	Concentración final base de cada reactivo utilizado en la optimización de PCR	38
8	Frecuencias de alelos obtenidos con los catorce microsatélites	41
9	Frecuencias de alelos obtenidos con los catorce microsatélites (continuación)	42
10	Diversidad genética para cada locus en la población	45
11	Análisis de Hardy-Weinberg para cada locus	46
12	Distancia de Nei para la población Maravillas en relación a controles altos y enanos	47
13	Identidad de Nei para la población Maravillas en relación a controles altos y enanos	47
14	Tamaño de alelos para las catorce secuencias microsatélites	63
15	Tamaño de alelos para las catorce secuencias microsatélites (continuación)	64

LISTA DE FIGURAS

Figura		Pág
1	Palma de coco (<i>Cocos nucifera</i>) en Finca Baltimore, Izabal	2
2	Partes de la semilla del cocotero	4
3	Distribución natural y pre-colombina del cocotero	7
4	Sintomatología del Amarillamiento Letal en cocoteros, <i>Cocos nucifera</i> L	10
5	Diagrama que muestra el polimorfismo de los microsatélites debido a las diferencias en su longitud	19
6	Sitio de colecta: Finca "Maravillas" en el departamento de Ocos, San Marcos	26
7	Esquema general de la metodología	27
8	Electroforesis en gel de agarosa al 1% para muestras de ADN representativas obtenidas mediante el protocolo de extracción de ADN	37
9	Productos de PCR de optimización en electroforesis de agarosa para muestras representativas con microsatélites A3, B6, C12, E2, H4 y H7	39
10	Gel de secuenciación microsatélites G11-H4	55
11	Gel de secuenciación microsatélite H7	56
12	Gel de secuenciación microsatélites A9-C3'	57
13	Gel de secuenciación microsatélite E10	58
14	Gel de secuenciación microsatélite E12-F2	59
15	Gel de secuenciación microsatélites C12-E2	60
16	Gel de secuenciación microsatélites B6-B12	61
17	Gel de secuenciación microsatélite C7	62
18	Frecuencia de alelos obtenidos con el microsatélite A3	65
19	Frecuencia de alelos obtenidos con el microsatélite A9	65
20	Frecuencia de alelos obtenidos con el microsatélite B6	65
21	Frecuencia de alelos obtenidos con el microsatélite B12	66
22	Frecuencia de alelos obtenidos con el microsatélite C3'	66
23	Frecuencia de alelos obtenidos con el microsatélite C7	66
24	Frecuencia de alelos obtenidos con el microsatélite C12	67
25	Frecuencia de alelos obtenidos con el microsatélite E2	67
26	Frecuencia de alelos obtenidos con el microsatélite E10	67
27	Frecuencia de alelos obtenidos con el microsatélite E12	68
28	Frecuencia de alelos obtenidos con el microsatélite F2	68
29	Frecuencia de alelos obtenidos con el microsatélite G11	68
30	Frecuencia de alelos obtenidos con el microsatélite H4	69
31	Frecuencia de alelos obtenidos con el microsatélite H7	69
32	Frecuencias de los catorce microsatélites	43
33	Heterocigosidad observada y esperada para los catorce locus	45
34	Dendrograma que muestra la relación entre la población estudiada y los controles altos (WAT) y enanos (MYD)	47

RESUMEN

En este trabajo se caracterizó molecularmente mediante 14 secuencias microsatélites (A3, A9, B6, B12, C3', C7, C12, E2, E10, E12, F2, G11, H4' y H7) una población de cocoteros previamente identificada en el puerto de Ocos en la finca "Maravillas", como parte de un programa de replantación del Atlántico, área afectada por el Amarillamiento letal del cocotero.

Se estandarizó una técnica de extracción, amplificación por PCR con los catorce iniciadores y electroforesis en gel de secuenciación, comprobándose que el método utilizado sí permitió detectar el tamaño de secuencias microsatélites para los cocoteros. Se determinó las frecuencias alélicas para cada locus determinándose que todos los locus estudiados fueron polimórficos, siendo el locus más polimórfico el locus A3 y el menos polimórfico el locus E2.

Se realizó varios análisis estadísticos, indicando que la población no se reproduce aleatoriamente, sino que existe endogamia, resultado tanto de la habilidad limitada de dispersarse como de la autopolinización en los cocoteros. Asimismo, se determinó que la población no está en equilibrio para ninguno de los catorce marcadores microsatélites, sin embargo en base al aislamiento geográfico de otras poblaciones de cocoteros, sus características morfológicas y a la ausencia de cocoteros enanos en las cercanías, se determinó que la población no está en equilibrio debido únicamente a la reproducción no aleatoria, por lo que puede considerarse que la población sí se encuentra aislada genéticamente. Tanto la distancia como la identidad genética de Nei obtenidas, indicaron que la población "Maravillas" se encontraba genéticamente más cercana y es más parecida a la población de cocoteros altos que a los cocoteros enanos.

Finalmente, debido a que la población "Maravillas" se puede considerar genéticamente aislada y a que se encuentra más cercana a los cocoteros altos, podría presentar resistencia al ALC, por ello es una buena candidata para utilizarse para producción de semillas certificadas que podrían ser utilizadas para pruebas de resistencia al ALC en el Atlántico.

I.INTRODUCCIÓN

El Amarillamiento Letal del Cocotero, o ALC, es una enfermedad que ataca principalmente palmáceas en todo el Caribe. Esta enfermedad ha causado daños en la economía de países como Jamaica y México. Ha afectado a comunidades garífunas e indígenas, cuya dieta depende en buena parte del cocotero, en países como Guatemala y Honduras. Aunque la enfermedad ya era conocida hace más de cuatro décadas, su presencia en Guatemala no se confirmó sino hasta el año 2001. En dicho año el Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación (MAGA) realizó un monitoreo a nivel nacional para encontrar los lugares en donde se encontraba presente el ALC. Las muestras obtenidas durante dicho monitoreo se analizaron en el laboratorio de Virología Vegetal de la Universidad del Valle de Guatemala. Se comprobó que el ALC ya había llegado al país y que se localizaba únicamente en el departamento de Izabal, en la región costera colindante con Honduras.

Durante el “Primer congreso nacional sobre Amarillamiento Letal del Cocotero” realizado en Guatemala en el año 2003, se planteó la importancia de iniciar un programa formal de replantación en las zonas afectadas. Uno de los principales componentes en dicho programa de replantación es la caracterización de las poblaciones de cocoteros que existen en el país. Son de especial interés las variedades de cocoteros altos en la costa del Pacífico debido a que, hasta ahora, esta es un área libre de ALC. Además, la costa del Pacífico guatemalteca podría presentar variedades similares a algunas ya caracterizadas en México, las cuales presentan, además de resistencia al ALC, características de interés, especiales para la industria, como cantidad de agua, calidad de la carnaza y contenido de fibra. Es muy importante que las poblaciones de cocoteros altos que se utilicen para la producción de semillas certificadas sean poblaciones de cocoteros altos puros alejadas de otras variedades, especialmente variedades enanas, ya que de esta forma habrá mayor certeza acerca del genotipo de las semillas recolectadas en la población.

Como parte de dicho programa de replantación, en el presente trabajo se caracterizó molecularmente mediante 14 secuencias microsatélites una población de cocoteros previamente identificada en el puerto de Ocosingo. Dicha población se encuentra geográficamente aislada y presenta características de importancia para la industria por lo que es una buena candidata para utilizarse para producción de semillas certificadas. Como se mencionó anteriormente, es importante que dicha población sea una población de cocoteros altos genéticamente puros. Con este estudio se determinó mediante genética de poblaciones, si dicha población se encuentra en equilibrio genético, es decir, si se encuentra aislada, es decir si es una línea pura y si se encuentra genéticamente más cercana a una población de cocoteros altos.

A. Antecedentes

1. El cocotero (*Cocos nucifera* L.). *Cocos nucifera*, conocida comúnmente como “coco” y “palma de coco” se encuentra distribuida en los trópicos y en la mayoría de las regiones subtropicales y es probablemente la palma más conocida. La propagación del cocotero ocurre a través de semillas, y bajo condiciones normales no es posible propagarlo vegetativamente. Cuando las semillas maduran suelen caer de los árboles sin sufrir daños y tres a siete meses después germinan. Durante ese tiempo las semillas pueden ser transportadas por la gente o por corrientes marinas a través de grandes distancias y establecer colonias en otras regiones. Después de 7 años cada axila foliar tiene el potencial de producir una inflorescencia; este potencial se mantiene hasta que la planta alcanza una edad de 80 años cuando se vuelve senil. El cocotero se siembra extensamente por su fruto, que es comestible y como planta ornamental. El fruto es una importante fuente de alimento, bebida, aceite, fibra y combustible. Del tronco del cocotero se puede extraer madera y otros productos derivados de ella (Harries 2001; Parrotta 1993).

a. Descripción. *Cocos nucifera* es la única especie del género *Cocos* (Familia Arecaceae, subfamilia Cocoideae) (Perera *et al.* 2000). Es una palma alta con un tronco delgado, a veces curvo y a veces recto, que no se ramifica. El tronco está cubierto por una corteza parda o gris ligeramente rajada, a menudo se encuentra ensanchado e inclinado en la base y puede alcanzar alturas promedio de 10 a 20 metros. Cuando las condiciones de cultivo son buenas, las palmas producen una hoja nueva cada 3 a 4 semanas. Cada axila foliar puede llegar a producir una inflorescencia que posee flores masculinas y femeninas en donde puede ocurrir una polinización cruzada que asegura una producción de hasta cerca de 100 semillas por año (Harries 2001; Parrotta 1993).

Figura 1. Palma de coco (*Cocos nucifera*) en Finca Baltimore, Izabal



Fuente: Mejía, Fredy Laboratorio de Protección Vegetal, Universidad del Valle de Guatemala.

De la palma adulta cuelgan racimos de frutos en todos los estados de madurez. Los frutos constan de una nuez protegida por una corteza fibrosa muy gruesa que soporta los impactos cuando el fruto maduro cae al suelo (Harries 2001; Parrotta 1993).

1) Hojas. Las copas de los cocoteros están formadas por 25 a 36 hojas o frondas, y el número de éstas depende de la variedad. Las hojas miden de 4.9 a 6.2 metros de largo y poseen 70 a 100 pares de hojuelas o folíolos. En promedio, los árboles maduros producen 1 fronda nueva cada mes, por lo que es posible estimar la edad de una palmera contando el número de cicatrices anulares en el tallo y dividiendo esta cantidad por 12 (Parrotta 2001).

2) Flores. Cuando las condiciones de crecimiento son favorables la floración de los cocoteros inicia a los 6 años de edad cuando las plantas tienen una altura de 2.5 a 4.5 metros. La floración dura todo el año y continúa hasta que el árbol alcanza la madurez, usualmente a los 60 años cuando la palma llega a una altura de 25 a 30 metros. Las variedades enanas e híbridas de cocos empiezan a florecer a los 4 ó 5 años (Parrotta 2001).

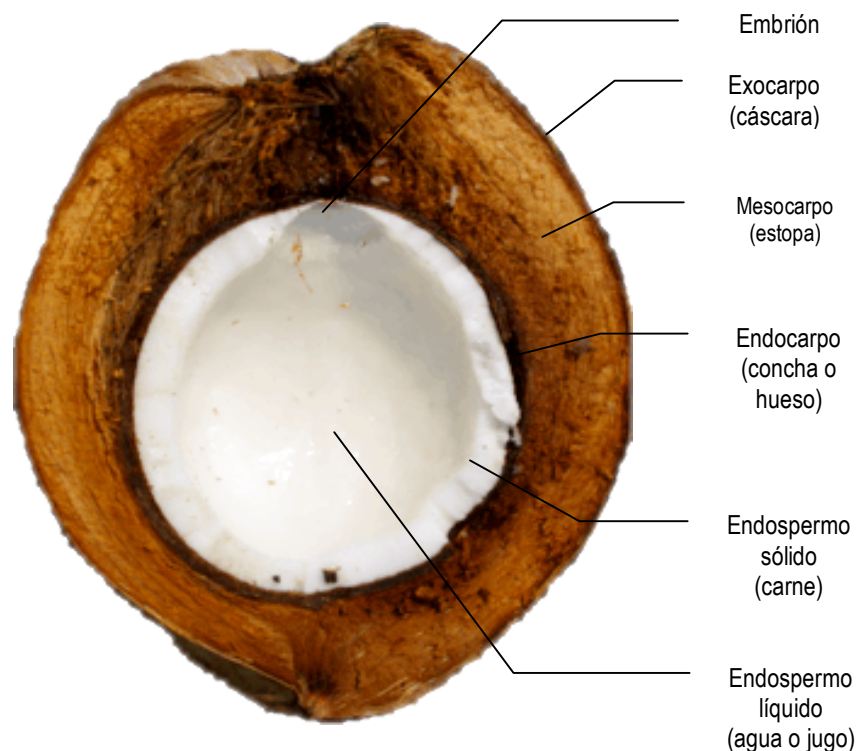
Como se había mencionado anteriormente, las inflorescencias de los cocoteros tienen tanto flores masculinas como femeninas. Las inflorescencias son ramificadas y tienen 90 a 120 centímetros de largo; cada una consiste en un eje central y 10 a 45 ramas laterales. Cada axila foliar es capaz de producir una inflorescencia. Las flores femeninas se sitúan en la base del eje principal o en un máximo de 5 flores por rama. En las ramas laterales crecen hasta 200 flores masculinas por rama, y contienen seis glándulas de néctar que atraen distintos agentes polinizadores. Las flores masculinas tienen un ancho de 3 a 6 mm, y las femeninas, de mayor tamaño, tienen un ancho de 30 a 35 mm (Parrotta 2001).

Entre las 6:00 y las 8:00 a.m. se abren las flores masculinas y se desprenden durante la tarde. En las variedades altas las flores femeninas se abren aproximadamente dos semanas después de las masculinas y permanecen receptivas por 2 a 4 días, mientras que en variedades enanas la apertura de ambas flores es casi simultánea. Por lo tanto, en las variedades altas predomina la polinización cruzada por distintos agentes polinizadores, en especial abejas, avispas, escarabajos, hormigas y moscas, mientras que en las variedades enanas hay una mayor tasa de autofecundación (Parrotta 2001).

3) Frutos. La nuez del coco puede ser elíptica u ovoide, con tres lados no bien definidos. A veces la fruta es casi redonda con 20 a 30 cm de largo. Los frutos tienen una cáscara fibrosa cuyo color depende de la variedad y puede ser desde amarillo hasta completamente verde pasando por tonos rojizos y pardos. El tamaño máximo se alcanza entre 5 y 6 meses y maduran completamente a los 10 ó 13 meses. Es común el aborto de frutas inmaduras y puede llegar a representar el 70% de la carga total de la planta (Parrotta 2001).

Básicamente la fruta es una semilla hueca muy grande que está cubierta por una capa fibrosa (ver Figura 2). Cuando la fruta alcanza 8 cm de ancho la cavidad interna se empieza a llenar de un jugo producido por el saco embrionario a medida que se desarrolla. La cantidad de jugo aumenta hasta que el endospermo se desarrolla y empieza a disminuir a medida que la fruta madura, pero sin llegar a desaparecer por completo hasta que empieza la germinación (Parrotta 2001).

Figura 2.
Partes de la
semilla del
cocotero



Fuente: Mejía, Fredy Laboratorio de Protección Vegetal, Universidad del Valle de Guatemala

Las frutas se secan en el árbol y se tornan un color pardo opaco antes de caer, independientemente del color de la fruta madura. Un árbol maduro puede producir al menos cuarenta frutas por año. Los cocos maduros pueden flotar hasta 4 meses sin perder su viabilidad, por lo que pueden ser diseminadas grandes distancias (Parrotta 2001).

Los cocos no poseen una etapa inactiva y a veces los embriones pueden empezar a germinar cuando las frutas se encuentran aún unidas al árbol madre. En la naturaleza lo usual es que transcurran 4 meses después de la caída de los frutos antes de que empiecen a

emerger las plántulas. Esto implica que las frutas recién colectadas deben almacenarse a temperatura ambiente por 3 a 4 semanas antes de sembrarlas, con el fin de que el embrión tenga tiempo suficiente para madurar.

3) Desarrollo. El embrión del coco se sitúa bajo el botón suave que se encuentra en el endospermo (Figura 2). La germinación inicia cuando la plúmula o yema primaria empieza su elongación. La parte inferior del cotiledón se desarrolla en un órgano absorbente y esponjoso, el haustorio que comúnmente se conoce como “manzana”, éste crece lentamente hasta llenar la cavidad central mientras se desarrollan raíces adventicias en la base de la plúmula. Las raíces y la plúmula atraviesan el botón suave del endospermo mientras que el haustorio absorbe y digiere los nutrientes almacenados en el endospermo para alimentar estas estructuras (Parrotta 2001).

Al inicio la plántula desarrolla cuatro a cinco hojas inmaduras o vainas foliares, luego dos a seis hojas plegadas y finalmente las hojas pinadas típicas de las plantas maduras. Cuando las plántulas desarrollan al menos 3 hojas verdaderas están listas para ser trasplantadas al campo, y esto suele ser 25 a 30 semanas después de iniciada la germinación (Parrotta 2001).

Las plántulas se siembran en hoyos en la tierra de 60 cm de profundidad y 60 cm de diámetro, con un espaciamiento triangular de 9 metros. Durante los primeros años son muy susceptibles a daños en las raíces producidas por roedores, por lo tanto es recomendable protegerlas con cercados individuales cercanos a los tallos (Parrotta 2001).

b. Variedades de cocoteros. La clasificación primaria de los cocoteros se basa en la estatura y hábitos de fecundación y se divide en dos categorías principales: variedades enanas y variedades altas. Las variedades altas crecen hasta una altura de 20 a 30 metros y son alógamos, tienen un florecimiento tardío y sus semillas tienen un tamaño mediano a grande. Las variedades altas son robustas y crecen en un gran rango de condiciones ambientales. Las variedades enanas alcanzan alturas de hasta 15 metros y son autógamos con un florecimiento temprano y generalmente producen una gran cantidad de semillas pequeñas con formas y colores característicos (Perera *et al.* 2000).

Se considera que existen dos tipos de cocoteros altos. El tipo Nie kafa evolucionó de manera natural y fue diseminado por corrientes oceánicas mientras que el tipo Nie vai fue resultado de la selección de los Nie kafa en cultivos hechos por el hombre. La introgresión de estos dos tipos y la selección y dispersión posterior hecha por el hombre produjo una gran cantidad de variedades. El origen de los enanos aún es controversial (Perera *et al.* 2000).

En México se ha logrado identificar tres ecotipos principales de cocoteros en la costa del Pacífico. Estos ecotipos presentan características de altos del Pacífico y las pruebas que se han realizado sobre su resistencia al ALC muestran que presentan una tolerancia moderada a

alta a esta enfermedad (Zizumbo *et al.* 1993; Zizumbo *et al.* 1998). En las visitas de campo realizadas a la costa sur en compañía con el Dr. Zizumbo se detectaron algunas poblaciones que presentan características similares a las variedades mexicanas (Mejía, Fredy Laboratorio de Protección Vegetal, Universidad del Valle de Guatemala, fmejia@uvg.edu.gt, Comunicación personal).

c. Hábitat. Las áreas en donde se encuentra coco tienen un clima tropical cálido y húmedo. Para un crecimiento óptimo el cocotero necesita una temperatura promedio de 27 a 35°C durante todo el año y una variación diurna limitada. La precipitación pluvial en las zonas de producción varía entre 1,200 y 2,300 mm. El coco puede sobrevivir con precipitaciones de hasta 5,000 mm, pero el exceso de humedad disminuye la producción de frutos. El cocotero puede soportar períodos cortos de intensa sequía, pero si la falta de agua se prolonga 5 a 6 meses la producción puede verse afectada varios años después (Parrotta 2001).

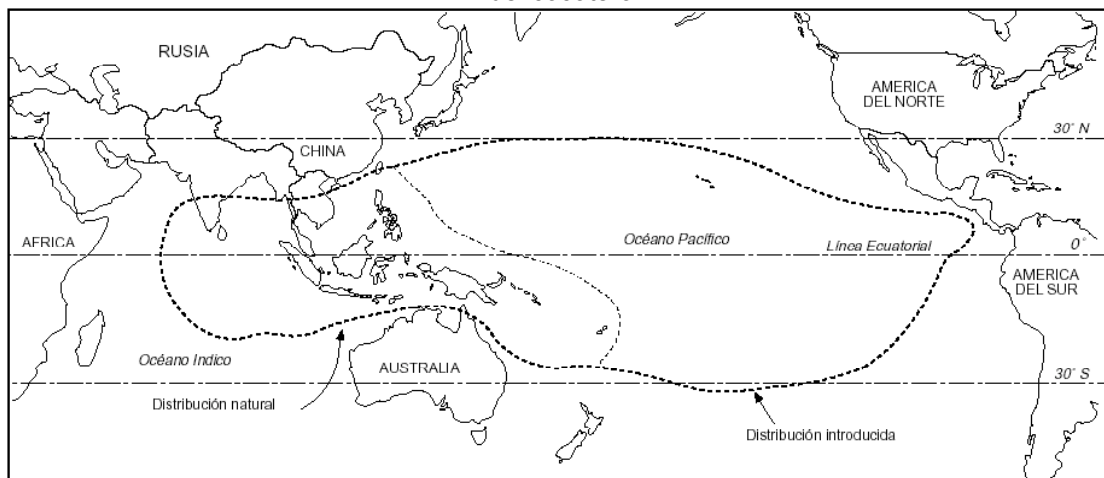
El cocotero tiene una alta tasa de transpiración, pero es preferible sembrarlo en climas secos que en húmedos cuando el suelo puede retener la humedad. Por estas características el cocotero crece mejor a lo largo de las costas tropicales y subtropicales, en general a lo largo de las márgenes de fuentes de agua. Para un crecimiento óptimo se necesitan suelos arenosos bien drenados y profundos, con pH de 5.5 a 8.0. Es recomendable un alto contenido de materia orgánica, pero no es indispensable (Parrotta 2001).

La altura máxima a la que se puede cultivar cocotero es de 1,200 m SNM cerca de la línea ecuatorial y de 900 m SNM a altitudes mayores. La producción comercial suele estar limitada a sitios con alturas menores a 600 m SNM (Parrotta 2001).

d. Breve historia del cocotero. Los cocotereros se desarrollaron en el océano Indo-Pacífico durante las eras terciaria y cuaternaria. La distribución original del coco pudo haberse extendido desde las islas Seychelles en el oeste hasta las islas Line en el este. Es posible que la selección natural favoreciera a los frutos con características que les permitieran flotar y anclarse a las cosas, y las poblaciones de cocos con estas características tienen un ritmo de germinación relativamente lento y variable (Harries 2001; Parrotta 1993; Zizumbo y Quero 1998).

Es probable que la colonización en lugares remotos y geográficamente aislados se debiera a la dispersión por flotación de unos cuantos individuos. El aislamiento reproductivo llevó a una diferenciación marcada entre las poblaciones. En la actualidad, el polimorfismo que se observa entre los cocotereros es el resultado de la selección de frutos hecha por humanos. La selección de frutos con un alto contenido de agua pudo haber sido un factor predominante en la domesticación de esta planta (ver Figura 4) (Harries 2001; Parrotta 1993; Zizumbo y Quero 1998).

Figura 3. Distribución natural y pre-colombina del cocotero.



Fuente: Parrotta 1993

En América, existe evidencia en las descripciones de Oviedo (siglo XVI) que apoyan la hipótesis de que el cocotero estaba presente en la costa del Pacífico en Costa Rica, Panamá y Colombia al momento de la llegada de los españoles. Estas observaciones sugieren que el coco llegó por medios naturales y por la ayuda de humanos (Harries 2001; Zizumbo y Quero 1998).

e. Importancia económica en Guatemala. En Guatemala no existen indicadores estadísticos ciertos sobre la importancia económica del cocotero; en parte, la falta de información se debe a que el cocotero se sigue considerando un cultivo de traspatio y no se ha evaluado su verdadera importancia. El apareamiento de ALC, sin embargo, ha aumentado el interés público por la situación de los cocoteros en el país y se tienen algunas cifras que permiten estimar la importancia de este cultivo (Mejía, Fredy Laboratorio de Protección Vegetal, Universidad del Valle de Guatemala, fmejia@uvg.edu.gt, Comunicación personal).

El cuadro 1 muestra los volúmenes de exportación a El Salvador de cocos registrados durante los años 2,001 a 2,003.

Cuadro 1. Volumen y valor de las exportaciones de coco a El Salvador registrados en la ventanilla de exportaciones

Año	Volumen (Kg)	Valor (US\$)
2001	27,272	800
2002	113,637	5,000

2003	1,977,140	62,399
------	-----------	--------

Fuente: Unidad de Normas y Regulaciones, Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación, Guatemala

Estos datos quizá no reflejen un aumento en las exportaciones de coco a través de los años, pero si muestran que en los últimos años se ha prestado más atención a su control. De manera indirecta esto podría deberse, como se mencionó anteriormente, a un mayor interés por este cultivo. El valor de las exportaciones registradas a El Salvador en lo que va del año 2006 muestran que, probablemente, se alcance una cifra de US\$ 100,000 a finales de año (Unidad de Normas y Regulaciones, Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación, Guatemala).

Si se considera que este cuadro presenta una situación muy especial, y no toma en cuenta la exportación a otros países y el comercio interno, resulta evidente que el cocotero podría ser más importante de lo que se había estimado hasta ahora. Es necesario realizar estudios económicos más profundos sobre el tema para poder cuantificar exactamente el valor económico y social de este cultivar.

f. Amarillamiento letal del cocotero

1) Generalidades. El amarillamiento letal del cocotero, ALC, es una enfermedad que ataca a más de 33 especies de palmáceas, incluida la palma cocotera (*Cocos nucifera* L.). La enfermedad es causada por una bacteria sin pared celular perteneciente al grupo de los fitoplasmas; estas bacterias se encuentran en mayor cantidad en los tejidos cribosos del floema y son transmitidas por insectos vectores. Otra característica importante de los fitoplasmas es que aún no ha sido posible su cultivo en condiciones de laboratorio (Arellano y Oropeza 1995).

Debido a que no ha sido posible aislar a los fitoplasmas de plantas enfermas, su clasificación ha sido dificultosa. Hasta ahora la mejor técnica para identificarlos ha sido su caracterización molecular. Los estudios realizados con la secuencia del gen que codifica para el ARN de la subunidad 16S del ARN ribosomal (16S ARNr) han permitido la clasificación de los fitoplasmas en más de 12 grupos. El fitoplasma causante del ALC en la región del Caribe pertenece al grupo 16SrIV (Davis y Sinclair 1998).

Los principales vectores de los fitoplasmas son homópteros de las familias *Cicadellidae* y *Fulgoromorpha*. Para el ALC se reconoce al *Myndus crudus* como el vector en la región del Caribe, sin embargo existen observaciones tanto en campo como en laboratorio que sugieren la posible existencia de otros vectores involucrados en la transmisión del ALC (Arellano y Oropeza 1995).

2) Historia del Amarillamiento Letal del Cocotero en el Caribe. Los primeros registros que se tienen de cocoteros con síntomas muy similares al Amarillamiento Letal datan de 1834 en las islas Gran Caimán. La enfermedad se empezó a observar en otros países del Caribe, aunque es muy probable que los síntomas se hayan confundido con los provocados por otras enfermedades, hasta que en la década de 1960 empezó una epidemia de Amarillamiento Letal (ALC) en plantaciones de coco en el extremo este de Jamaica. En esa misma década parecieron brotes de ALC en los cayos de Florida, pero la dispersión fue lenta y aparentemente cesó (Arellano y Oropeza 1995; Eden-Green 1995).

Jamaica era el país más afectado del Caribe, y aún no se conocía la etiología del ALC, por lo que se inició una serie de estudios que ponían a prueba factores nutricionales, ambientales y presión a poblaciones de insectos para tratar de determinar su origen. Debido a los patrones de transmisión, se sospechaba que la enfermedad era causada por un agente infeccioso y transmitida por un vector aéreo (Eden-Green 1995).

A principios de la década de 1970 se empezó a reportar casos de ALC en el territorio continental de Florida (1971). En esta misma década se logró identificar al agente causante de la enfermedad por microscopía electrónica, observaciones que fueron reforzadas con el hecho de que los síntomas se revertían con el uso de antibióticos como tetraciclina. Es de notar que en Jamaica, en la década de 1950, se empezó a introducir una variedad de cocotero conocida como "Enano Malayo"; se observó que dicha variedad es altamente resistente al ALC y se inició la creación de un banco de germoplasmas de cocotero por la "Coconut Industry Board" a principios de 1960. Estos descubrimientos abrieron las puertas a la investigación de la etiología y control del ALC en Jamaica y Florida a partir de los años 80 (Eden-Green 1995).

Actualmente la enfermedad se encuentra activa en todo el Caribe (Harrison y Richardson 1994), incluyendo Guatemala (MAGA 2001, Oropeza 2001). En la región Caribe, el ALC ha causado daños devastadores en los paisajes debido a la gran cantidad de cocoteros que han muerto ante la enfermedad, afectando a miles de familias cuyos ingresos económicos dependen directa o indirectamente del coco. Durante las últimas 50 décadas, millones de palmas han muerto a causa del Amarillamiento Letal (Arellano y Oropeza 1995).

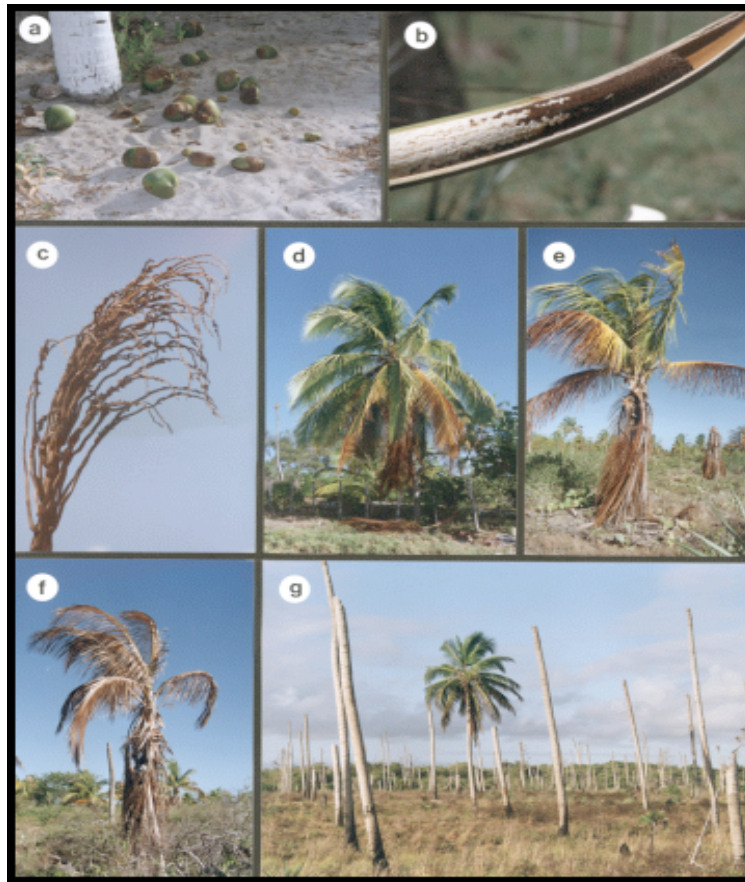
3) Sintomatología. El primer síntoma visual del Amarillamiento Letal es la caída prematura de frutos en cualquier estado de desarrollo (Figura 4a); los frutos caídos se caracterizan por tener una mancha necrótica debajo del periantio, el cual se puede separar fácilmente del fruto. Luego las inflorescencias nuevas se ennegrecen y son visibles al momento en que salen de la espata (Figura 4b). Las primeras inflorescencias tienen una necrosis parcial, pero a medida que la enfermedad progresa la necrosis cubre una mayor área de las inflorescencias nuevas. Las inflorescencias tienden a secarse y a corrugarse, un síntoma que Oropeza denominó como "garra de león" (Figura 4c), el cual sirve mucho para el

diagnóstico seguro de ALC, pero puede manifestarse en forma atípica y no puede ser visto en plantas demasiado jóvenes que no produzcan inflorescencias (Arellano y Oropeza 1995; Howard y Harrison 2000).

El amarillamiento de las hojas suele empezar cuando hay dos o más inflorescencias necróticas. La decoloración de las hojas empieza por las hojas más viejas (inferiores) hacia las hojas más jóvenes (superiores, Figura 4d-4e). El amarillamiento de las hojas debido al ALC ocurre a una velocidad mayor que el debido a la senescencia natural de la planta. Hay ocasiones en que una hoja joven se amarillenta antes que el resto, a la cual se le denomina "hoja bandera". La hoja bandera es muy importante en el diagnóstico de ALC por su sintomatología, pero no es un síntoma que se observe en todos los casos (Arellano y Oropeza 1995; Howard y Harrison 2000).

Las hojas amarillentas se secan (Figura 4f), se tornan de color café claro y quedan colgando del tronco durante algunos días antes de caer. En la última etapa de la enfermedad la "hoja asta", en el extremo superior del tronco muere como consecuencia del colapso del vástago. La muerte del vástago puede ocurrir antes de la caída de todas las hojas, pero la muerte del vástago es equivalente a la muerte de la planta, y pocos días después queda únicamente el tronco (Figura 1g) (Arellano y Oropeza 1995; Howard y Harrison 2000).

Figura 4
Sintomatología del Amarillamiento Letal
en cocoteros, *Cocos nucifera* L.



Fuente: Arellano y Oropeza 1995

4) Control de la enfermedad. Se ha intentado controlar al ALC usando distintos enfoques: (i) control de vectores; (ii) control químico de la enfermedad; (iii) saneamiento; (iv) control cultural y cuarentenas; y, finalmente, (v) siembra de variedades de cocotero resistentes.

El control de vectores usando insecticidas no ha sido exitoso debido al complejo ciclo de vida de los insectos y al alto costo de los productos químicos. Es posible que un manejo adecuado de malezas sea una solución más práctica para el control de los insectos en plantaciones comerciales. El control químico de la enfermedad se basa en el uso de antibióticos tetraciclínicos. Estos antibióticos inhiben la síntesis de proteínas en los fitoplasmas y se ha comprobado su efectividad para revertir la sintomatología en plantas enfermas, pero al interrumpirse el tratamiento la planta vuelve a enfermar. Además de este inconveniente, el tratamiento es bastante costoso y no resulta práctico para plantaciones comerciales. El saneamiento consiste en tumbiar las palmas enfermas con el fin de reducir la fuente de inóculo para los vectores. Esta medida puede resultar efectiva para disminuir el tiempo de propagación de la enfermedad, pero no ha sido efectiva para erradicarla (Been 1995; Howard y Harrison 2000).

Las medidas de control cultural, cuarentenario y siembra de variedades resistentes son las medidas más útiles que se han aplicado para el control del ALC en otros países afectados. El

control cultural consiste en la concientización de la población en general y en la siembra de otras especies de palmáceas con fines ornamentales en zonas turísticas afectadas por el ALC (Been 1995; Howard y Harrison 2000).

El uso de plantas resistentes es, hasta la fecha, la principal herramienta para el control del ALC. Se conoce poco sobre la naturaleza genética de la resistencia de algunas variedades e híbridos de cocoteros frente al Amarillamiento Letal; esto se debe en parte a que no ha sido posible cultivar *in vitro* a los fitoplasmas y a que la identificación de las variedades resistentes de *Cocos nucifera* es lenta (Been 1995; Howard y Harrison 2000; Eden-Green 1995; Zizumbo y Arellano 1995).

La técnica que se usó durante mucho tiempo para detectar un material posiblemente resistente es observar las plantas que parecen sanas dentro de zonas donde el ALC se encuentra muy activo. Sin embargo, la comprobación que un material es suficientemente resistente para ser usado comercialmente requiere de un análisis muy riguroso de los datos experimentales (Been 1995).

Se sabe que la resistencia de las distintas variedades de cocoteros varían según la región en la que se encuentren plantados. No se sabe si las diferencias se deban a factores ambientales, bióticos o ambos. No se conoce una variedad que tenga una resistencia absoluta, y en los casos en que el ALC se manifiesta en dichas variedades lo hace con la misma severidad con que lo hace en las especies menos tolerantes. A pesar de que se ha relacionado algunas características fisiológicas de las palmeras con su grado de resistencia, la evidencia observada hasta el momento parece indicar que la naturaleza de la resistencia de algunas variedades opera en el momento de la infección y no durante la multiplicación del fitoplasma causante del ALC (Eden-Green 1995; Howard y Harrison 2000).

En Jamaica se han realizado pruebas para determinar la resistencia al ALC de cocoteros extraídos de la zona del Canal de Panamá. En estos estudios se ha visto un nivel de resistencia importante útil para los programas de mejoramiento. El híbrido "Maypán", un cruce de "Enano Malayo" × "Alto de Panamá" resultó en una de las mejores variedades para el control del ALC por muchos años (Zizumbo y Quero 1998). El estudio de la diversidad de cocoteros en el Pacífico centroamericano podría llevar al descubrimiento de genotipos útiles para combatir el ALC y otras enfermedades (Mejía, Fredy Laboratorio de Protección Vegetal, Universidad del Valle de Guatemala, fmejia@uvg.edu.gt, Comunicación personal).

2. Genética de poblaciones. La genética de poblaciones es el estudio de la variación genética en poblaciones naturales y de los factores que influyen en esta variación (Tabachnick y Black 1995).

Las técnicas utilizadas para la identificación de variaciones genéticas en poblaciones naturales han ido evolucionando, y gracias a esto actualmente los estudios ya no son teóricos. Las primeras técnicas utilizadas fueron las de identificación de mutantes morfológicos, por medio de los cuales se hacían evidentes las características heredadas en forma recesiva; el estudio de las variaciones cromosómicas estructurales, conocida como inversión cromosomal; y la del uso de isoenzimas. Esta última técnica ha generado un extenso repertorio de información acerca de la genética de poblaciones (Tabachnick y Black 1995).

a. Poblaciones naturales. La palabra población, utilizada en el sentido de genética de poblaciones, se refiere a un grupo de individuos de la misma especie que viven dentro de un área geográfica suficientemente restringida como para que cualquier miembro dentro de ella pueda aparearse al azar con otro miembro (Hartl 1988).

Las unidades fundamentales de estudio en la genética de poblaciones son las poblaciones locales, es decir, unidades dentro de una población en las cuales ocurre cruzamiento entre parientes; ya que es dentro de estas unidades o poblaciones donde ocurren los cambios en las frecuencias de alelos que son tan importantes para la evolución adaptativa de una característica. Como se verá más adelante, existen factores que afectan la frecuencia genotípica dentro de una población. En general el modelo más utilizado para determinar la estabilidad de un genotipo es el de Hardy-Weinberg, el cual asume que el organismo que se está estudiando es diploide y se reproduce sexualmente, que no existe un traslape entre generaciones, y el apareamiento es al azar dentro de una población muy grande, que la migración es imprescindible y la mutación puede ignorarse, y que la selección natural no afecta los alelos que se están considerando (Hartl 1988).

b. Variación genética

1) Equilibrio de Hardy-Weinberg y los factores que afectan la variación: El equilibrio de Hardy-Weinberg indica que en una población grande, con apareamiento al azar en ausencia de selección, migración y mutación, las frecuencias genotípicas y fenotípicas permanecen constantes de generación en generación, es decir que está en equilibrio genético (Beaty and Marquardt 1996; Curtis and Barnes 1989; Mettler *et al.* 1988; Hartl 1998; Hartl and Clark 1989).

El planteamiento de Hardy-Weinberg resume los factores responsables de los cambios en las frecuencias génicas de cualquier población: reproducción no aleatoria, tamaño de la población, migración, mutaciones, selección natural, flujo de genes y barreras biológicas. Se pueden examinar las frecuencias de genotipos para determinar si una población se encuentra en equilibrio de Hardy-Weinberg. Este equilibrio puede verse como una hipótesis nula acerca

de los factores antes enumerados. Si cualquiera de ellos afecta significativamente las frecuencias, la población no estará en equilibrio (Beaty and Marquardt 1996).

Para determinar si una población está en equilibrio de Hardy Weinberg, se toma una muestra de cierto número de individuos y se estiman las frecuencias alélicas y genotípicas. Los números observados y los esperados se comparan usando una prueba no paramétrica tal como el χ^2 . Cuando se analizan varios locus diferentes se obtiene una descripción más exacta de la población (Beaty and Marquardt 1996).

Cuando se analiza si una población está en equilibrio se asume que la muestra de individuos proviene de una población con cruzamiento aleatorio o panmítica. Si la muestra es de hecho una mezcla de dos poblaciones genéticamente diferentes, la población puede no encontrarse en equilibrio de Hardy-Weinber (Beaty and Marquardt 1996).

Los factores que provocan cambios en las frecuencias genotípicas son principalmente cinco:

a) Apareamiento al azar: cuando dos genotipos dentro de una población no se aparean al azar, se dice que es una clasificación de apareamiento positiva, y tendrá como consecuencia la reducción en la frecuencia de heterocigotos dentro de la población. La frecuencia con la que aumentan los homocigotos dentro de una población es una función del grado de relación entre los individuos que se aparean; es decir, que esta frecuencia aumentará rápidamente cuando existe un apareamiento entre padres e hijos o entre los mismos hijos (Tabachnik y Black 1996).

b) Tamaño de la población: el tamaño de la población afecta grandemente el equilibrio de Hardy-Weinberg, ya que una población muy pequeña está sujeta a un mayor efecto sobre la frecuencia genotípica y fenotípica, como consecuencia de selección natural o muestreo. En teoría las poblaciones deben de ser grandes y constantes en tamaño, pero en la realidad el tamaño de una población puede variar (Tabachnick y Black 1996). A los cambios en frecuencia debidos al azar se le conoce como deriva genética. La deriva genética afecta la heterocigosidad observada en una población, de manera que puede llegar a reducirse de tal forma que un solo alelo podría llegarse a fijar en la población (Tabachnick y Black 1996).

c) Migración: la inmigración de individuos introduce genes nuevos a una población, así como la emigración puede ser responsable de cambios en frecuencia de genes especiales. Si ocurre migración entre dos poblaciones que difieren en frecuencia genética, las frecuencias genéticas de cada población cambiarán; si este intercambio es constante, la migración provocará eventualmente que ambas poblaciones tengan frecuencias genéticas similares. A este apareamiento entre emigrantes entre poblaciones se le conoce como flujo genético (Tabachnick y Black 1996).

d) Mutación: la tasa de mutación afecta la frecuencia de genes. Una mutación es fuente de material genético completamente nuevo. La tasa de mutación está estimada en el orden de 10^{-6} por locus por generación, aunque para regiones no codificadas esta tasa es mayor (Tabachnick y Black 1996).

e) Selección: la selección es un factor determinante, ya que en distintos individuos varía la aptitud de los genes, y por lo tanto la aptitud que le confieren al individuo que los porta (Tabachnick y Black 1996).

Todas las fuerzas anteriores, forman el patrón de variación. El origen, mantenimiento y forma de los patrones de variación en poblaciones son la esencia de la evolución (Mettler *et al.* 1988).

La variación es sólo una forma de expresar que existen diferencias entre individuos. Los caracteres por los cuales los individuos difieren usualmente caen dentro de dos categorías, rasgos cuantitativos y mendelianos. Los rasgos mendelianos son caracterizados por fenotipos discretos que no se traslapan, mientras que los rasgos cuantitativos exhiben una distribución continua. Cuando una o más formas de rasgos mendelianos están presentes en una población con altas frecuencias, la población es polimórfica. Los genes obviamente difieren en su modo de acción y en sus efectos en el fenotipo. Deben ser estos diferentes modos de acción los que dan origen a la distinción entre rasgos mendelianos y cuantitativos (Mettler *et al.* 1988).

Algunos investigadores han especulado que los genes de rasgos cuantitativos son reguladores y que los genes de rasgos mendelianos son estructurales (Mettler *et al.* 1988).

Dentro de una población, la variación es generalmente definida en términos de diferencias individuales a partir del promedio de la población para rasgos cuantitativos, y en términos de frecuencias de fenotipos mutantes en el caso de rasgos mendelianos. Cualquiera que sea la cantidad de variación genética existente, se ha encontrado que es suficiente (en los genes que se han estudiado) como para establecer que en la mayoría de las poblaciones, no existen dos individuos con el mismo genotipo para todos sus genes (exceptuando gemelos idénticos u otros nacimientos idénticos y múltiples) (Hartl 1988).

2) Métodos utilizados para el estudio de variación genética: Mucha de la genética de poblaciones fue inicialmente teórica debido a que sólo los mutantes morfológicos estaban disponibles, y éstos a menudo son segregados como marcadores recesivos. Los estudios empíricos requerían de técnicas que permitieran la identificación de ambos alelos en un individuo. Las técnicas más utilizadas en la actualidad son: mutantes polimórficos, inversión

cromosómica, isozimas y marcadores de ADN. En esta sección se ampliará acerca de las técnicas que involucran ADN (Yáñez 2002).

a) Marcadores moleculares: Un marcador es un carácter o un gen que debido al ligamiento puede usarse para indicar la presencia de otro gen; es decir, cualquier característica A (sea un gen, una proteína, tipo de hoja, etc.) que esté asociada a la presencia o expresión de una característica B (como vigor, altura, resistencia a enfermedades, etc.) puede considerarse como un marcador, pues la presencia de A necesariamente implica la de B (Yáñez 2002).

La importancia de los marcadores radica en que ofrecen la posibilidad de estudiar poblaciones de organismos y seleccionar aquellos que presentan rasgos de interés para el hombre. En ocasiones, el uso de marcadores permite seleccionar los individuos aun antes de que expresen el rasgo de interés. Gracias al empleo de marcadores ha sido posible mejorar muchas especies que son la base de la alimentación del mundo. Hay dos tipos principales de marcadores: los marcadores morfológicos y los marcadores moleculares (Yáñez 2002).

Los marcadores moleculares corresponden a cualquier gen cuya expresión permite un efecto cuantificable u observable (características fenotípicas), que además puede detectarse fácilmente. Este tipo de marcadores pueden evaluarse desde que los individuos están en sus primeros estadios de desarrollo y se pueden aplicar usando a todo el individuo o sólo parte de él. Se habla de marcadores genéticos cuando se transmiten según las leyes básicas de la herencia mendeliana, por lo que es importante destacar que no todos los marcadores moleculares pueden considerarse como genéticos. Existen dos tipos de marcadores moleculares: los marcadores bioquímicos y los marcadores de ADN (Yáñez 2002).

Los primeros marcadores desarrollados a finales de los 70 se basaron en la identificación de proteínas e isoenzimas por electroforesis en geles de almidón o poliacrilamida. Con ellos se abrió el conocimiento de la estructura y heterogeneidad genética entre diferentes especies, variedades y poblaciones de distinto origen geográfico. Pero esta técnica tenía una limitación muy importante: no era capaz de detectar suficiente polimorfismo entre variedades o especies próximas debido a que las proteínas son el resultado de la expresión génica, que puede ser distinta de unos tejidos a otros, de una etapa de desarrollo a otra, de un medio ambiente a otro, y de una época del año a otra (Claros 2000).

Los marcadores de ADN constituyen la nueva generación de marcadores moleculares y solucionaron el problema de la carencia de marcadores que tenían las isoenzimas, pues son capaces de generar una cantidad virtualmente infinita de marcadores. Existen varias técnicas para identificar marcadores de ADN, las que se pueden agrupar en tres categorías: las de

hibridación tipo Southern, las de reacción de polimerización en cadena (PCR) y las que combinan PCR o sus productos de ADN con la hibridación tipo Southern (Yáñez 2002).

La hibridación consiste en la formación de una molécula de doble cadena mediante el apareamiento o unión de bases complementarias de dos moléculas de una sola cadena. La hibridación tipo Southern explora las variaciones en la longitud o tamaño de los fragmentos de ADN ocasionadas por la restricción del genoma mediada por una enzima particular (endonucleasa). Esta técnica comprende las siguientes etapas: primero se extrae el ADN del material que deseamos estudiar; luego se le adicionan enzimas de restricción (endonucleasas), las cuales cortan el ADN en fragmentos de diferente longitud; estos fragmentos son separados en geles de agarosa, para después realizar por capilaridad o al vacío la transferencia de los fragmentos a una membrana de papel de nitrocelulosa o de nylon (transferencia tipo Southern). Finalmente, se hibridizan los fragmentos de la membrana con sondas marcadas (radiactiva o no radiactivamente) para visualizar y detectar las bandas hibridadas (Yáñez 2002). Las técnicas que utilizan la hibridización de ADN con ADN se usan para estimar la cantidad de divergencia de secuencias entre distintos genomas, pero no puede producir datos de carácter discreto y por lo tanto no pueden usarse para determinar la naturaleza en las variaciones genéticas (Yáñez 2002).

Dentro de esta técnica se encuentran los marcadores RFLP (polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción) y los VNTR (secuencias adyacentes que se repiten en número variable) (Yáñez 2002).

Dentro de la metodología de PCR se encuentran los marcadores llamados RAPD (ADN polimórfico amplificado al azar), PCR iniciada con microsatélites (MP-PCR), AFLP (polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados) y DAF (amplificación de huellas del ADN), entre otros. Con éstas técnicas la variación en las secuencias se puede examinar indirectamente por métodos de electroforesis al comparar fragmentos de ADN usando como criterio el número, tamaño o conformación. Aunque estos resultados tienen una resolución menor que los obtenidos por la comparación directa de las secuencias, son suficientemente robustos y tienen un costo favorable y por lo tanto se pueden aplicar a un número mayor de muestras (Dowling *et al.* 1996).

Finalmente, dentro de las metodologías que combinan la PCR o sus productos de ADN mas la hibridación tipo Southern, están los RAHM también llamados RAMPO (amplificación aleatoria del polimorfismo de microsatélites) (Yáñez 2002).

Los marcadores de ADN son muy ventajosos ya que no son afectados por el ambiente, están presentes en cualquier estadio del individuo, permiten una detección temprana, son universales, muy abundantes, se requiere poca cantidad de ADN para los análisis y el ADN es

muy estable y específico para cada individuo (huella génica). Sin embargo, son relativamente costosos, necesitan personal entrenado, equipos sofisticados y un estricto control de la contaminación (Yáñez 2002).

El uso de marcadores moleculares en los análisis genéticos y en el mejoramiento de las plantas ha tenido una difusión extremadamente rápida. Las principales aplicaciones incluyen la obtención de “huellas genéticas” (fingerprinting) genómicas de individuos, variedades y poblaciones; el análisis de la estructura y diversidad genética en poblaciones naturales y de mejoramiento y bancos de germoplasma; el establecimiento de relaciones filogenéticas entre diferentes individuos y especies; la construcción de mapas genéticos de alta cobertura genómica y la localización de genes de interés económico, mapeo de características de herencia cuantitativa QTL (Quantitative Trait Loci) y selección MAS auxiliada por marcadores (Marker Assisted Selection) (Yáñez 2002).

El análisis del ácido desoxirribonucleico (ADN) se ha convertido en una herramienta muy importante para los estudios sobre ecología evolutiva, genética de poblaciones y sistemática. El estudio del ADN tiene algunas ventajas importantes en comparación con otros métodos ya que permite identificar genotipos, no solamente fenotipos. Además, se puede seleccionar las secuencias de importancia para los estudios de evolución, los métodos son bastante generales y requieren pequeñas modificaciones según la técnica exacta y finalmente, se puede extraer muestras relativamente estables de ADN de pequeñas cantidades de tejido (Dowling *et al.* 1996).

b) Microsatélites: los microsatélites o SSRs, iniciales de su nombre en Inglés (Simple Sequence Repeats), son secuencias cortas de DNA, de 1 a 6 nucleótidos, repetidas cierto número de veces (Fig. 1) y se encuentran esparcidos por todo el genoma de los organismos eucariontes (Tautz 1989) y procariontes (Zane *et al.* 2002). Han mostrado ser excelentes marcadores porque son muy polimórficos, están ampliamente distribuidos en el genoma y son codominantes (Knudson *et al.* 1996).

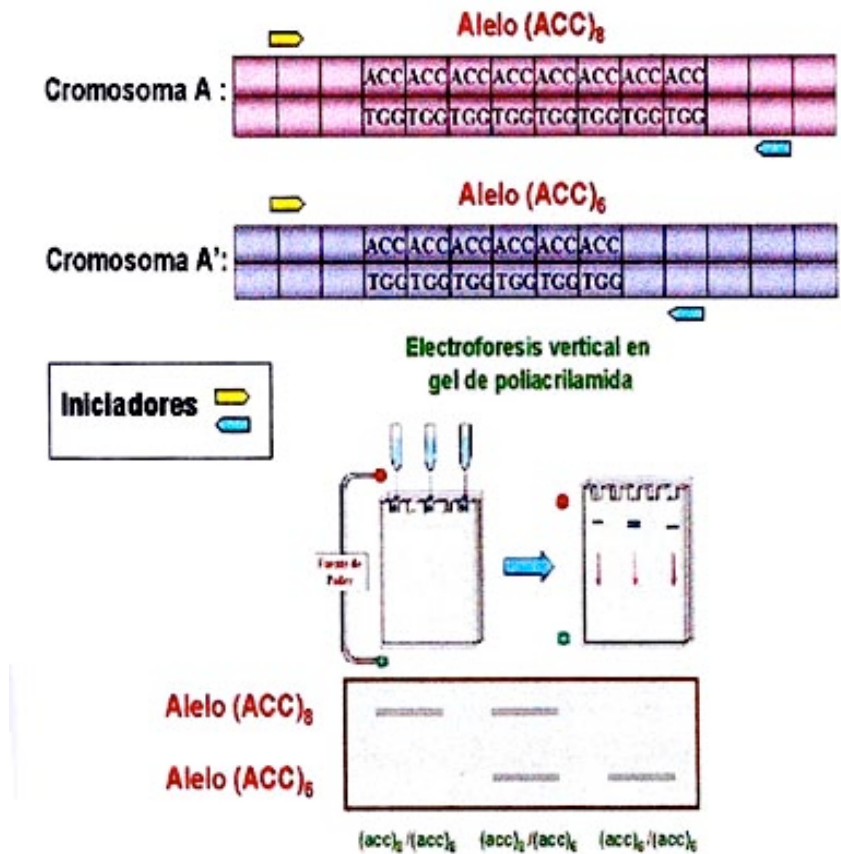
Cuando estas regiones son individualmente amplificadas por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando un par de oligonucleótidos flanqueantes como iniciadores, muestran casi invariablemente polimorfismo debido a las diferencias en su longitud, como consecuencia de la ocurrencia de los diferentes números de las unidades de repetición o motivos (Morgante y Olivieri 1993). El origen de tal polimorfismo está aún en debate, aunque previsiblemente éste se deba al evento de "resbalón" o slippage durante la replicación del DNA (Schlotterer y Tautz 1992; Zane *et al.* 2002), en el cual ya sea la cadena nueva o la cadena patrón se desliza sobre la otra en al menos un motivo, resultando en un mal apareamiento de las mismas (Moxon y Wills 1999). Otras posibles causas para la generación de polimorfismo se deben a otros tipos de mutaciones, como las deleciones e inserciones, ya sean en el

microsatélite en si o en las regiones que lo flanquean alterando el tamaño de la región microsatélite. La duplicación de una secuencia microsatélite en otra región del genoma da lugar a la generación de marcadores microsatélites multilocus (Jarne y Lagoda 1996; Villamón 2000).

Los microsatélites fueron inicialmente descritos en humanos, y en poco tiempo fueron hallados en otros mamíferos como el ratón y el cerdo. Su potencial como marcadores útiles para los estudios en plantas fue rápidamente reconocido, resultando en su aislamiento y aplicación en muchas especies (Rossetto *et al.* 1999). Es así, que los principales cultivos en la actualidad cuentan con una base de datos con apreciable cantidad de microsatélites como es el caso de la papa (Milbourne *et al.* 1998), yuca (Mba *et al.* 2001), arroz (Cho *et al.* 2000), trigo (Bryan *et al.* 1997) y cebada (Dávila *et al.* 1999), sólo para citar algunos ejemplos.

En la figura 5 se muestra que en un individuo diploide, el cromosoma A contiene el alelo (ACC)₈, mientras que el cromosoma A' en el locus homólogo presenta el alelo (ACC)₆. Mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), utilizando iniciadores diseñados en las regiones flanqueantes, los alelos son amplificados, para luego ser separados mediante una corrida electroforética. El diagrama muestra el patrón de bandas que deben determinar tanto los homocigotos como el heterocigoto para los mencionados alelos (Yáñez 2002).

Figura 5. Diagrama que muestra el polimorfismo de los microsatélites debido a las diferencias en su longitud.



Fuente: Yáñez 2002

En la mayoría de los casos, la interpretación de los microsatélites se realiza como alelos codominantes. Los productos de PCR se corren en la electroforesis adyacentes a secuencias conocidas de modo que el tamaño preciso de cada producto pueda ser determinado. En la mayoría de los casos, hay una considerable sombra debajo de la banda principal en el gel que se cree es debido a un fenómeno conocido en inglés como “replication slippage” durante la reacción de PCR, las mutaciones somáticas podrían ser otra alternativa. Los genotipos deben leerse cuidadosamente para identificar a los individuos heterocigotos y homocigotos; el patrón típico para un homocigoto es una banda dominante y dos sub bandas con dos pares de bases de separación, un heterocigoto presentará dos bandas similares en intensidad seguidas de dos sub-bandas. Los alelos se reportan por medio de su tamaño absoluto relativo a los alelos de controles de tamaño conocido que fueron cargados en el gel (Dowling *et al.* 1996).

c) Características de los microsatélites: La razón principal del incremento del uso de los SSRs como una herramienta molecular es que proveen la más alta incidencia de polimorfismo o PIC (Polymorphic Information Content) en comparación con otras técnicas como RFLPs y RAPDs (Powell *et al.* 1996). Poseen, además, muy valorables atributos que incluyen:

- Ser altamente informativos: presentan herencia codominante y muchos alelos son encontrados entre individuos estrechamente relacionados.
- Ser técnicamente simples: la tecnología del PCR puede fácilmente y rápidamente ser utilizada para la automatización en el uso de estos marcadores.
- Ser una técnica sensible: sólo pequeñas cantidades de DNA son requeridas.
- Ser analíticamente simples: los datos son producidos de forma confiable y altamente reproducibles.
- Ser muy abundantes: los microsatélites están uniformemente dispersos a través del genoma, aproximadamente cada 10 kbp.
- Ser ampliamente aplicables: los loci son frecuentemente conservados entre especies relacionadas y algunas veces entre géneros, y
- Ser de fácil intercambio de datos entre laboratorios: la información puede ser comunicada por la simple secuencia de los iniciadores, sin la necesidad de la transferencia física de los iniciadores (Yáñez 2002).

d) Clasificación de los microsatélites: Chambers y MacAvoy (2000) proponen que los términos puro (o perfecto), compuesto y complejo se utilicen para especificar que uno, dos o más tipos de motivos, respectivamente, se encuentran presentes a lo largo de un locus microsatélite dado, y que el término interrumpido (o imperfecto) como un descriptor

jerárquico adicional que implica una o más unidades no repetitivas en el interior de los microsatélites.

Cuadro 2. Tipos y ejemplos de microsatélites

Tipo de microsatélite	Ejemplos
SSR Puro	(ACC)9
SSR Interrumpido puro	(ACC)6 -TG - (ACC)7
SSR Compuesto	(ACC)5 -(TTG)9
SSR Interrumpido compuesto	(ACC)8-TG-(ACC)5-GA-(TTA)6
SSR Complejo	(ACC)-TG-(GA)12-(TTA)5-GC-(TTA)4+3

Fuente: Yáñez 2002

e) Limitaciones de los microsatélites: la única limitación significativa de los microsatélites puede ser la inversión inicial de recursos económicos y la experiencia técnica requerida para la clonación y secuenciación de los loci SSR (Yáñez 2002).

Por otro lado, limitaciones con menor frecuencia o efecto, se darían en el caso que mutaciones, ocurridas en el sitio de apareamiento de los iniciadores, tendrían como resultado alelos nulos. Otra limitación es la presencia de "bandas tartamudas". Estas últimas se encuentran frecuentemente asociadas con la amplificación de ADN repetitivo como es el caso los microsatélites. Las "bandas tartamudas" son productos de la amplificación por PCR que difieren en una unidad de repetición con respecto a la longitud del alelo original. La ocurrencia de estos artefactos dificulta la lectura de los geles, e inclusive, repetidamente son confundidos como alelos, complicando el análisis genotípico. Sin embargo estas consideraciones no han desalentado a muchos investigadores quienes han convertido a los microsatélites en una herramienta muy popular (Chambers y MacAvoy 2000). Una vez que las secuencias de los iniciadores son diseñadas y publicadas, el análisis de los loci microsatélites será práctico para cualquier laboratorio capaz de realizar las técnicas de PCR y electroforesis. El desarrollo inicial de los microsatélites puede ser simplificado utilizando técnicas más avanzadas como el uso de librerías enriquecidas para uno o más motivos. El ahorro en tiempo y recursos puede ser mejorado desarrollando el llamado "PCR multiplex", el cual permite la amplificación y la

recolección de datos simultánea de múltiples loci SSR con una sola muestra de DNA en una simple reacción de PCR en una sola línea del gel de electroforesis (Brown *et al.* 1996).

f) Iniciadores utilizados para amplificar secuencias microsatélites de cocoteros: en el cuadro 3 se presentan los nombres, secuencias y temperatura de fusión de los iniciadores a utilizarse para las secuencias microsatélites de cocoteros. Estos iniciadores fueron diseñados por el CIRAD.

3) Importancia de las pruebas moleculares: El estudio de la diversidad genética es un requisito importante en cualquier plan de cultivo sustentable. En la actualidad se tienen registrados más de 300 ecotipos de cocotero, cuya evaluación y caracterización se llevan a cabo principalmente con rasgos morfológicos y características reproductivas (Perera *et al.* 2000).

Los marcadores moleculares permiten evaluar los niveles y patrones de diversidad genética y se han usado en muchas otras especies vegetales. Aunque existen distintos métodos para estudiar la diversidad genética usando marcadores moleculares, el sistema que provee más información es el de microsatélites (Perera *et al.* 2000).

El desarrollo de microsatélites para cocotero se ha realizado en distintos centros de investigación desde hace algunos años. Actualmente se está tratando de estandarizar, al menos en el Caribe, la técnica desarrollada en el CIRAD (Mejía, Fredy Laboratorio de Protección Vegetal, Universidad del Valle de Guatemala, fmejia@uvg.edu.gt, Comunicación personal).

Cuadro 3. Nombres, secuencias y temperatura de fusión de iniciadores a utilizarse para las secuencias microsatélites.

Nombre del iniciador	Secuencia	Temperatura de fusión
CnCirA3	5'-AATCTAAATCTACGAAAGCA-3' 5'-AATAATGTGAAAAAGCAAAG-3'	46.2 °C 44.4 °C
CnCirA9	5'-AATGTTTGTGTCTTTGTGCGTGTGT-3' 5'-TCCTTATTTTTCTTCCCCTTCCTCA-3'	57.9 °C 55.6 °C
CnCirB6	5'-GAGTGTGTGAGCCAGCAT-3' 5'-ATTGTTACAGTCCTTCCA-3'	54.9 °C 50.9 °C
CnCirB12	5'-GCTCTTCAGTCTTTCTCAA-3' 5'-CTGTATGCCAATTTTTCTA-3'	49.4 °C 45 °C
CnCirC3'	5'-AGAAAGCTGAGAGGGAGATT-3' 5'-GTGGGGCATGAAAAGTAAC-3'	52.9 °C 51.2 °C
CnCirC7	5'-ATAGCATATGGTTTTCT-3' 5'-TGCTCCAGCGTTCATCTA-3'	44.7 °C 53.4 °C

CnC12	5'-ATACCACAGGCTAACAT-3' 5'-AACCAGAGACATTTGAA-3'	47 °C 44.7 °C
CnC2	5'-TCGCTGATGAATGCTTGCT-3' 5'-GGGGCTGAGGGATAAAC-3'	54.6 °C 54.9 °C
CnC10	5'-TCACGCAAAGATAAAC-3' 5'-ATGGAGATGGAAAGAAAG-3'	54.6 °C 55.4 °C
CnC12	5'-TCACGCAAAGATAAAC-3' 5'-ATGGAGATGGAAAGAAAG-3'	48.1 °C 49 °C
CnC2	5'-GGTCTCCTCTCCCTCTTATCTA-3' 5'-CGACGACCCAAAAGTGAACAC-3'	56.1 °C 56.2 °C
CnC11	5'-AATATCTCCAAAATCATCGAAAG-3' 5'-TCATCCCACACCCTCTCT-3'	49.3 °C 57.6 °C
CnC4'	5'-TTAGATCTCCTCCCAAAG-3' 5'-ATCGAAAGAACAGTCACG-3'	47.6 °C 49.6 °C
CnC7	5'-TTAGATCTCCTCCCAAAG-3' 5'-ATCGAAAGAACAGTCACG-3'	48.3 °C 48.6 °C

Fuente: CIRAD 2002

4) Suposiciones necesarias para medir la variación genética entre poblaciones usando datos de microsatélites

Antes de realizar el análisis de datos para determinar subestructuras de poblaciones es esencial estudiar la variación genética encontrada en los microsatélites para asegurarse que las suposiciones básicas bajo las cuales se basa la teoría no son violadas. Se necesita probar tres suposiciones principales. Primero debe analizarse la neutralidad selectiva de cada locus. Luego debe de identificarse la presencia de "alelos nulos" (alelos que no se detectan por medio del análisis con PCR). Finalmente, antes de que se puedan combinar los datos de varios locus, debe probarse la independencia de cada locus (Murria 1996).

La suposición de neutralidad selectiva de los microsatélites es la base de la mayoría del análisis de estos datos. Todos los análisis subsecuentes de datos se basan en la interacción de las fuerzas de deriva genética, mutación y/o migración. Una selección muy fuerte puede sobrepasar estas fuerzas. La selección en un locus puede estabilizar las frecuencias de alelos en todas las subpoblaciones y por consiguiente llevar a una sobreestimación de la subestructura genética de la población o de la distancia genética. Las diferencias en presiones selectivas entre regiones pueden causar la fijación de alelos en diferentes subpoblaciones y causar la sobreestimación de estos parámetros. Los efectos de selección pueden confundir los resultados y cualquier locus que está bajo presión selectiva debe excluirse del análisis. A pesar

de que se cree que la mayoría de microsatélites son neutrales, es probable la unión de estos marcadores a un locus bajo selección (Murria 1996).

B. Justificación

El cocotero es una planta con importancia cultural y con un alto potencial económico, sin embargo, su cultivo ha sido limitado en parte por el desconocimiento de su manejo y recientemente por enfermedades que lo atacan. Por esta razón es muy importante conocer los recursos genéticos con que cuenta el país, ya que podrían usarse en algún momento para fomentar la industrialización del cocotero y para la siembra de variedades con posible resistencia a enfermedades determinadas.

La conservación del coco es necesaria debido a su importancia ambiental, económica y social. Los cocoteros crecen muy bien en zonas costeras, y sus raíces ayudan a fijar los suelos evitando así el deterioro de las costas. No es muy conocido el aporte del cocotero a la economía del país, pero otros países en climas tropicales han logrado establecer importantes agroindustrias basadas en la explotación del cocotero; estas industrias podrían ser muy beneficiosas para Guatemala en un futuro mediano o cercano. Socialmente, el cocotero es importante para comunidades garífunas y kekchíes que habitan cerca de zonas costeras. Para estas comunidades el coco es un componente principal de sus dietas y forma parte de algunos tratamientos médicos tradicionales que practican.

La importancia del estudio de los materiales del país es evitar problemas imprevistos que resultan del movimiento de materiales provenientes del extranjero. Si se logra identificar germoplasmas valiosos dentro del territorio nacional se puede evitar la importación de semillas y plántulas de lugares en donde se desconoce el control de calidad de los materiales. Además, estos germoplasmas podrían ser reproducidos en Guatemala y comercializados, lo cual significaría una fuente adicional de ingresos para el país.

C. Objetivos

1. Objetivo general

- Estudiar la genética de poblaciones de la población de cocoteros altos (*Cocos nucifera L.*) en la finca Maravillas en el puerto de Ocos, San Marcos por medio del análisis de catorce marcadores microsatélites.

2. Objetivos específicos

- Optimizar la técnica de extracción de ADN y amplificación de PCR para detectar el tamaño de secuencias microsatélites para cocoteros.
- Determinar el polimorfismo que existe en el tamaño de secuencias microsatélites para los individuos dentro de la población de cocoteros altos (*Cocos nucifera L.*) en la finca Maravillas en el puerto de Ocós.
- Establecer la distancia e identidad genética de Nei entre la población de cocoteros altos (*Cocos nucifera L.*) en la finca Maravillas en el puerto de Ocós, cocoteros altos del pacífico (WAT) de la Aldea Sumach, Izabal y cocoteros enanos amarillos malayos (MYD) de la finca Baltimore, Izabal.
- Determinar el índice de heterocigosidad de la población de cocoteros altos (*Cocos nucifera L.*) en la finca Maravillas en el puerto de Ocós para cada locus.
- Determinar las frecuencias alélicas de cada locus en la población de cocoteros altos (*Cocos nucifera L.*) en la finca Maravillas en el puerto de Ocós.
- Establecer si la población de cocoteros altos (*Cocos nucifera L.*) en la finca Maravillas en el puerto de Ocós se encuentra en equilibrio de Hardy-Weinberg para los catorce marcadores microsatélites.

D. Hipótesis

- La población de cocoteros altos (*Cocos nucifera L.*) en la finca Maravillas en el puerto de Ocós, San Marcos es una población de cocoteros altos genéticamente aislada.
- La población de cocoteros altos (*Cocos nucifera L.*) en la finca Maravillas en el puerto de Ocós, San Marcos se encuentra genéticamente más cercana a los cocoteros Altos del Pacífico (WAT) de la Aldea Sumach, Izabal que a los cocoteros enanos amarillos malayos (MYD) de la finca Baltimore, Izabal.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Colección de muestras de tejido foliar de cocoteros

Se trabajó con 29 muestras de folíolos de hojas de cocoteros liofilizadas colectadas entre el 29/11/05 y 02/12/05 en la finca “Maravillas” ubicada en el puerto de Ocós, San Marcos. A continuación se muestra un mapa indicando el sitio de la colecta:

Figura 6. Sitio de colecta: Finca “Maravillas” en el departamento de Ocós, San Marcos.



Latitud: 14.53468

Longitud: -92.08189

Las muestras liofilizadas de cocoteros altos puros que se utilizaron como control fueron colectadas el 24/03/06 en la aldea Sumach, El Estor (Longitud: N 15.6043, Latitud: W 089.09580, Altitud: 16 m SNM), mientras que las muestras liofilizadas de cocoteros enanos malayos amarillos fueron colectadas el 7/11/05 en la finca Baltimore, Izabal.

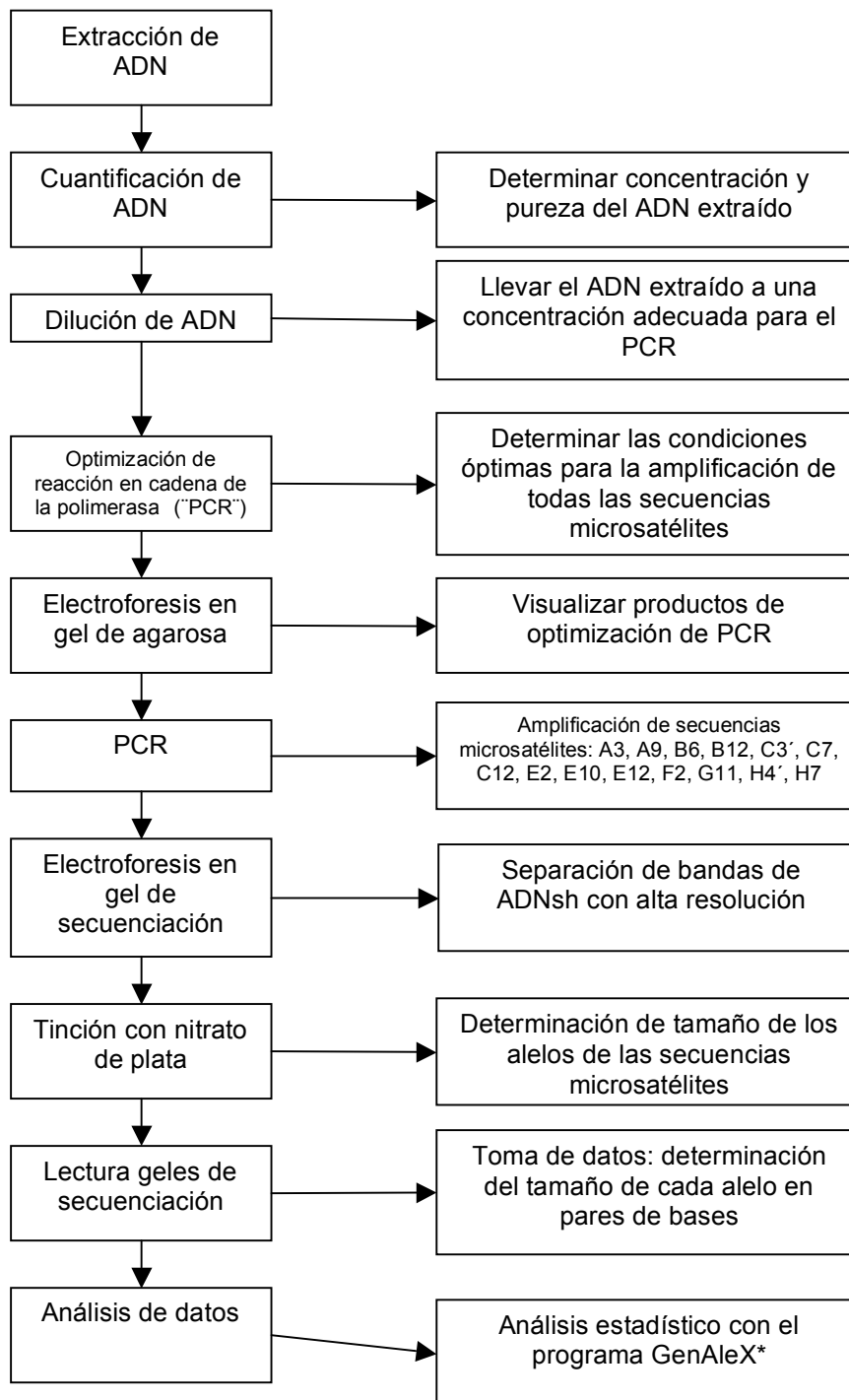
Para cada cocotero se tomaron dos folíolos intermedios de cada hoja. Estos folíolos se marcaron con marcador indeleble y se colocaron dentro de una cubeta de 25 l con 5 litros de agua y una lata de agua gaseosa sin colorantes de 350mL mezclada. Las muestras se llevaron inmediatamente al laboratorio para su análisis.

Al llegar al laboratorio las muestras se almacenaron entre 1 y 2 días en cuarto frío a 4°C, en oscuridad. Después se lavaron los folíolos con servilletas húmedas para eliminar el polvo y la suciedad de su superficie. A los folíolos limpios se les quitó la vena central y se enrollaron

en tubos corning de 50 ml. Los tubos con la muestra se almacenaron por 1 día aproximadamente a -20°C . Las muestras congeladas se liofilizaron por 1.5 días y luego se sellaron y almacenaron en el cuarto frío. Se prepararon dos tubos por cada muestra, uno para la extracción de ácidos nucleicos y el otro como reserva.

B. Esquema general de la metodología

Figura 7. Esquema general de la metodología



* Peakall, R. y P.E., Smouse. 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel

C. Extracción de ADN

Se realizó una extracción de ADN mediante el método miniprep (CTAB) con PVP-40 2% modificado propuesto por Luis Eguiarte y Valeria Souza (1997).

A continuación se detalla dicho protocolo modificado:

1. En 50 ml de CTAB 2% [2% CTAB (Sigma), Tris HCl (Sigma) 100mM pH 8, EDTA (Sigma) 20mM y NaCl (Merck) 1.4M] se añadió 1 g de PVP-40 (Sigma) y 50ul de β -mercaptoetanol (Sigma).
2. Se tomó un foliolo de coco enrollado y liofilizado y se introdujo en nitrógeno líquido por unos segundos.
3. El foliolo frío se molió en un molino de café hasta obtenerse un polvo fino.
4. En un tubo de 2 ml se introdujo 0.5 g de polvo de hoja de coco.
5. Se agregó 1500 ul del tampón CTAB 2% y se agitó muy bien.
6. Se centrifugó a 10,000 rpm durante 8 minutos a temperatura ambiente.
7. Se eliminó el sobrenadante y se añadió 600 ul del tampón CTAB 2% previamente incubado a 65°C durante 20 min.
8. Se agregó a cada tubo 600 ul de cloroformo-alcohol isoamílico (Merck) 24:1.
9. Se agitó hasta homogenizar y se centrifugó a 7000 rpm durante 15 min. a 4°C.
10. Se trasladó el sobrenadante a un tubo de 1.5 ml y se precipitó el ADN con 600 ul de isopropanol (Merck) frío.
11. Se dejó incubar a -20°C por 24 horas.
12. Se centrifugó a 9000 rpm durante 5 min a 4°C y se eliminó el sobrenadante.
13. Se dejó secar los tubos a temperatura ambiente.
14. El precipitado se limpió agregando 1 ml de etanol (Merck) frío al 70% y se centrifugó a 7000rpm durante 5 min a 4°C.
15. Se eliminó el sobrenadante, se dejó secar el precipitado por 15 min y se resuspendió el mismo con 50 ul de agua destilada estéril.
16. Se incubó a baño maría (37°C) alrededor de 30 min. para disolver el precipitado y se agregó 4 ul de RNAasaA (Sigma) incubándose 2 horas más.
17. Se almacenaron las muestras a -20°C.

D. Cuantificación y dilución de ADN

Con el fin de determinar la concentración y pureza del ADN extraído se utilizó el método espectrofotométrico y utilizando las concentraciones de ADN obtenidas se llevó el extracto a la concentración utilizada en el protocolo de PCR. A continuación se detalla el protocolo seguido:

1. Se encendió el espectrofotómetro ThermoSpectronic Genesys 10 uv 15 min. antes de iniciar el análisis.
2. Se buscó dentro de los análisis almacenados el programa de múltiples longitudes de onda ADN/ARN.
3. Se utilizó como blanco al tampón TE (10 mM Tris-Cl, pH 7.5 1 mM EDTA)
4. Se hizo una dilución del ADN extraído 1:80 en tampón TE mezclando 395 ul de tampón con 5 ul del ADN resuspendido en la celda de cuarzo.
5. Se homogenizó vigorosamente y se limpió la celda utilizando kimwipes.
6. Se introdujo la celda y se leyó las absorbancias a las siguientes longitudes de onda: 320 nm, 260 nm y 280 nm.
7. Se enjuagó la celda entre muestras con agua destilada.
8. Las absorbancias de A260 y A280 se corrigieron restándoles la absorbancia a 320 nm.
9. Se calculó la concentración de ADN convirtiendo la absorbancia corregida a 260 nm de acuerdo al siguiente factor de conversión: 1 A = 50 ng/ul de ADN. Se corrigió por la dilución llevada a cabo multiplicando por 80.
10. La pureza del ADN se calculó dividiendo la absorbancia a 260 nm entre la absorbancia a 280 nm. Una razón mayor de 2 indicó contaminación de cloroformo y una absorbancia menor de 1.8 indicó contaminación de proteínas.
11. De acuerdo a la concentración de ADN obtenida se diluyó a 20 ng/ul y a partir de esta dilución a 5 ng/ul en tampón TE.
12. Se almacenaron las muestras a -20°C.

E. Reacción en cadena de la polimerasa ("PCR")

Inicialmente se optimizaron las condiciones generales de la reacción con varias pruebas con distintas condiciones, variando la concentración de iniciadores, MgCl₂, dNTP's y ADN, volumen total y temperatura de hibridización. A partir de las distintas combinaciones de condiciones se eligió la combinación de condiciones que presentó un producto de amplificación más claro visualizado en la electroforesis en gel de agarosa.

A continuación se detalla el protocolo final utilizado para amplificar las 14 secuencias microsátélites.

1. Se preparó la cantidad de tampón de reacción [MgCl₂ (Promega) 2mM, Tampón 1X (Promega), dNTPs (Promega) 0.2 mM c/u, iniciador* 0.1 uM c/u, agua destilada desmineralizada y Taq polimerasa (Promega) 1U] necesaria para el número de muestras que se amplificaron (29 muestras, 2 controles positivos: MYD y WAT y un control negativo).

2. Se colocó 20ul tampón de reacción en cada tubo de 0.5 ul (tubos expuestos a luz ultravioleta por 10 min.)

*Ver cuadro 3 para nombres y secuencias de iniciadores. Los mismos fueron sintetizados por Invitrogen sin sales, reconstituyéndose a una concentración de 100 uM. La solución de trabajo utilizada fue de 1uM. Tanto la soluciones madre como las soluciones de trabajo se almacenaron a -20°C.

a. Reconstitución de iniciadores

- 1) Se centrifugó cada tubo por unos segundos para precipitar todo el ADN.
 - 2) Para determinar el volumen de agua destilada desionizada a agregar para la reconstitución se multiplicó la cantidad de nanomoles sintetizados por 10.
 - 3) Se agregó el volumen de agua determinado.
 - 4) Se esperó 2 min y luego se agitó con vórtex por 15 s.
3. Se agregaron 25 ng de muestra a cada tubo (5 ul de muestra a 5 ng/ul).
 4. Se colocaron los tubos en el termociclador MJ research, Inc. PTC-100 y se inició el programa: COCO51.

Cuadro 4. Programa para PCR utilizado para la amplificación de todas las secuencias microsátélites

Paso	Temperatura	Tiempo
1	94°C	5 min
2	94°C	30 s
3	52°C	1 min
4	72°C	1 min
5	Repetir	40 ciclos
6	72°C	30 min
7	4°C	Indefinido

F. Electroforesis en gel de agarosa

Se siguió el siguiente protocolo con el objetivo de visualizar los productos de amplificación en la optimización del PCR.

1. Se pesó 0.45 g de agarosa (Sigma) y se le agregaron 30 ml de tampón TAE 1X (Tris 40 mM (pH 8.0), ácido acético (Merck) 20 mM, 1 mM EDTA) (gel al 1.5%) o 1.2 g en TAE 1X (gel al 4%).
2. Se calentó por 30 s en microondas hasta disolver toda la agarosa.
3. Se dejó enfriar hasta aproximadamente 60°C.
4. La mezcla se vertió en el molde de la cámara de electroforesis horizontal con el peine y se dejó polimerizar (aproximadamente 45 min).

5. Se llenó la cámara con tampón TAE 1X y se removieron los peines.
6. Se agregó a los pozos en la placa de montaje 1 ul de tampón de montaje (Promega) por cada muestra.
7. Se le agregó 6 ul de producto de PCR al microlitro de tampón de montaje y se mezcló bien. Luego se cargó esta mezcla en el gel.
8. En los pozos de los extremos se cargó 6 ul del marcador molecular (Promega 50bp) con 1ul de buffer de montaje.
9. Se conectó la cámara a la fuente de poder y se corrió la electroforesis por 1 hora a 60 V.
10. Se retiró el gel y se sumergió en una solución de bromuro de etidio 0.5uL/mL por 2 min.
11. Se retiró de la solución de bromuro y se destiñó el gel en agua destilada por 2 min.
12. Para visualizar las bandas de ADN en gel se irradió con luz ultravioleta.
13. Por último se fotografió el gel (mientras se irradió con UV).

G. Electroforesis en gel de secuenciación

Los productos de amplificación de las catorce secuencias microsatélites fueron separados utilizando geles de secuenciación, visualizándose los alelos de las secuencias microsatélites mediante la tinción con plata. A continuación se presenta el protocolo utilizado:

1. Preparación de cristales o placas de vidrio

- a. Se remojaron los 2 cristales (uno grande y uno pequeño) durante 30 min. en una solución de NaOH (Merck) al 10%.
- b. Se lavó con detergente común y esponja.
- c. Se enjuagó con agua destilada y alcohol 70%.
- d. Se dejó secar.
- e. Se aplicó una dilución de Bind silane (Sigma) (6 ul de Bind silane en 1ml de agua destilada) al cristal pequeño con un kimwipe.
- f. Se aplicó 1 ml de Sigmacote (Sigma) al cristal grande con un kimwipe.
- g. Se dejaron secar ambos.
- h. Se repitió la aplicación de bind silane y sigmacote.
- i. Se dejaron secar ambos nuevamente.
- j. Se colocó separadores en ambos lados y en la parte de abajo del cristal más grande, se colocó el vidrio pequeño encima (las caras a las que se les aplicó el bind y el Sigmacote debieron quedar hacia adentro, una frente a la otra).
- k. Se sujetaron ambos con pinzas alrededor.

2. Preparación de la solución de acrilamida

- a. Después de fijar los cristales se preparó la solución para el gel: Acrilamida + persulfato de amonio+TEMED.
- b. Solución para elaborar el gel de acrilamida

Reactivo	Cantidad
*Acrilamida-Bisacrilamida 19:1	
al 6% con Urea 7.5 M (Sigma)	65 ml
**Persulfato de amonio (Merck)	270.5 ul
al 10%	
TEMED (Merck)	86.6 ul

*La solución de acrilamida es tóxica, por lo que se evitó salpicar durante su manejo.

**El persulfato se mantuvo a -20°C.

3. Vaciado y polimerización del gel

- a. Se vació la solución anterior entre los cristales evitando que se formaran burbujas.
- b. Inmediatamente se colocó un peine invertido en la parte superior para delimitar la línea superior del gel.
- c. Se dejó polimerizar la acrilamida (aprox. 15 min. después de que polimerizó la acrilamida sobrante).
- d. Se retiraron las pinzas, el peine superior y el separador inferior, se limpió con etanol al 70% lo que hubiera caído en la parte exterior de los cristales. Se lavó y enjuagó con agua destilada.

4. Pre-corrida

- a. Se aplicó vaselina en la parte superior de la cámara de electroforesis vertical (ThermoElectron EC1600) para evitar fugas del tampón de corrida.
- b. Se colocaron los cristales en la cámara de electroforesis.
- c. Se agregó 1 litro de TBE 0.5X (Tris 0.89 M, Acido bórico (Merck) 0.89M, EDTA 0.025M). Se agregaron 500 ml en la parte superior y 500 ml en la parte inferior.
- d. Se verificó que no hubiera fugas.
- e. Se corrió durante media hora a 1425 V constantes.

5. Preparación de muestras

- a. Durante el tiempo de la precorrida se prepararon las muestras que se agregaron al gel. Se le agregó a cada muestra tampón de carga (NaOH 10 mM, Formamida (Merck) 95%, Azul de bromofenol (Merck) y naranja G (Merck) al 0.05%) en una relación 1:1.
- b. Se desnaturalizaron las muestras (incluyendo el marcador de masa molecular) calentándolas a 94°C por 5 minutos en el termociclador.

6. Carga de las muestras al gel

- a. Antes de cargar las muestras en el gel se detuvo la precorrida; se colocó un peine para definir las cavidades en las que se depositó la muestra.
- b. Se agregaron las muestras y se realizó la electroforesis (se corrió por 1 hora 30 min. bajo las mismas condiciones de la precorrida).

7. Tinción del gel con nitrato de plata

Se utilizaron 3 soluciones (fórmulas para 1.5 l):

Solución 1: Ácido acético 10%

Reactivo	Cantidad
Ácido acético (Merk)	150 ml
Agua destilada	1350 ml

Solución 2: Nitrato de plata

Reactivo	Cantidad
Nitrato de plata (Merck)	1.50 g
*Formaldehído 37% (Merck)	2.25 ml
Agua destilada	1.5 l

Solución 3: Carbonato de sodio

Reactivo	Cantidad
Carbonato de sodio (Merck)	45 g
Agua destilada	1.5 l
*Tiosulfato 2% (Merck)	5 ul
*Formaldehído	3 ml

*Estas soluciones se mantuvieron en el congelador a -20°C y se agregaron al momento de utilizar la solución.

- a. Se sacó el tampón de la parte de arriba antes de sacar los cristales.
- b. Se sacaron los cristales de la cámara de electroforesis, se limpiaron y se retiraron los separadores del costado.
- c. Se despegaron con la ayuda de un cuchillo o espátula (el cristal pequeño contiene el gel).
- d. Se colocó el gel en la solución 1 (ácido acético al 10%) manteniéndose en agitación durante 30 min.
- e. Durante este tiempo se prepararon las soluciones 2 y 3, sin agregar el tiosulfato y el formaldehído en ambas, ya que estos compuestos se agregaron al momento de utilizarlas. Se pusieron en el congelador ya que se debía utilizar frías.
- f. Al terminar los 30 min., se guardó la solución de ácido acético, ya que sirvió al final para detener la reacción de revelado.
- g. Se aplicaron 3 lavados al gel de 2 min. c/u con agua destilada.
- h. Se colocó el gel en la solución 2 durante 30 min. Después se realizó un enjuague rápido (sólo se sumergió y se sacó de nuevo el gel) con agua destilada.
- i. Se agregó el formaldehído y el tiosulfato a la solución 3 y se vertió la mitad en el tercer recipiente; se sumergió el gel y se agitó manualmente hasta que la solución se empezó a oscurecer y se empezaron a distinguir las bandas en el gel, en este momento se desechó la solución.
- j. Se agregó la otra mitad de la solución 3 y se dio otro lavado para definir las bandas, NO se excedió porque el gel quedaría muy oscuro (sobretinción).
- k. Se colocó el gel en la solución de ácido acético que se utilizó al principio, para detener la reacción de carbonato de sodio, durante 5 min., se enjuagó con agua destilada y se dejó secar.

H. Lectura del gel de secuenciación

1. Cuando el gel estaba completamente seco, se colocó sobre una fuente continua de luz blanca para visualizar las bandas de ADN. Se rotuló con un marcador negro indeleble. Se registró la fecha, el nombre de la población que se está corriendo en el gel y a qué muestra y microsatélite pertenece cada pozo. Se debió identificar en qué posición se cargó el marcador de tamaño y se asignó a cada banda su valor en número de bases.
2. Se colocó una regla de 30 cm con el 0 exactamente sobre el inicio del gel. Se tomó la medida en cm de la migración de la banda de interés cerciorándose de que la regla estuviera completamente alineada entre el inicio y el final de la placa. Se leyeron todos los individuos del gel tomando en cuenta que los

individuos homocigotos presentan una sola banda principal y los heterocigotos presentan dos.

3. Del mismo modo que se leyeron las muestras, se leyeron los controles y el marcador de tamaño molecular.
4. En una hoja electrónica se graficó el promedio de la migración en cm de las bandas del marcador molecular y se graficó este promedio vrs. el logaritmo del tamaño de cada una de las bandas. Se calculó una regresión lineal.
5. Con los valores de la ecuación y la medida en cm de la migración de las bandas de los individuos se calculó el tamaño en bases de cada uno de los alelos que aparecen por individuo.
6. Se digitalizó la imagen de los geles a fin de guardar un registro de éstos.

I. Análisis de datos

1. Se ingresaron los datos de tamaño en pares de bases para cada alelo obtenido para cada muestra en el programa Microsoft Excel según el formato establecido por el programa GenAIEx6 (Peakall y Smouse 2006).
2. Siguiendo las funciones propias del programa GenAIEx6 se determinó lo siguiente: frecuencias de cada alelo en cada locus por población, gráficas de frecuencia de cada alelo por locus por población, número de alelos, número de alelos efectivos, heterocigosidad esperada y observada, índice de fijación, estadísticas F, distancia genética de Nei y valores de equilibrio de Hardy-Weinberg.

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A. Cuantificación y verificación de pureza de ADN extraído

Con el fin de evaluar si calidad y cantidad de ADN obtenida con el método de extracción de ADN descrito en la sección de métodos eran apropiadas, se midió la absorbancia a distintas longitudes de onda para cada muestra. A continuación se presentan los resultados obtenidos:

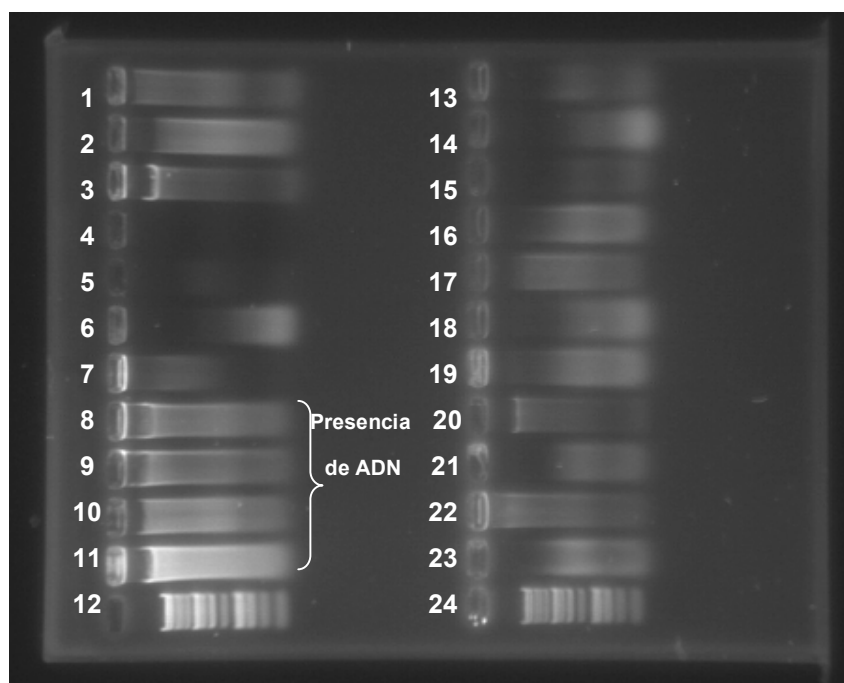
Cuadro 5. Absorbancias a 260, 280 y 320 nm, razón A260/A280 y concentración de muestras obtenidas a partir del método de extracción de ADN.

Muestra	A260	A280	A320	A260/A280	Concentracion (ng/ul)
1.2	0.233	0.162	0.049	1.63	736
2.1	0.211	0.148	0.052	1.66	636
3.1	0.281	0.184	0.08	1.93	804
4.2	0.144	0.1	0.038	1.71	424
6.1	0.191	0.111	0.034	1.84	628
7.2	0.189	0.15	0.057	1.62	528
8.1	0.357	0.248	0.099	1.73	1032
9.1	0.249	0.186	0.072	1.55	708
10.1	0.377	0.284	0.126	1.59	1004
11.1	0.103	0.138	0.047	1.62	224
12.2	0.039	0.031	0.012	1.67	108
13.2	0.072	0.054	0.006	1.68	264
14.2	0.041	0.038	0.012	1.72	116
15.2	0.326	0.192	0.054	1.97	1088
16.2	0.314	0.209	0.077	1.80	948
17.1	0.325	0.238	0.103	1.64	888
18.1	0.242	0.169	0.073	1.76	676
19.2	0.293	0.196	0.061	1.72	928
20.1	0.222	0.131	0.043	1.83	716
21.2	0.177	0.112	0.045	1.97	528
22.2	0.418	0.29	0.109	1.71	1236
23.2	0.294	0.212	0.107	1.78	748
24.1	0.029	0.032	0.012	1.85	68
25.1	0.154	0.105	0.029	1.64	500
26.1	0.371	0.274	0.121	1.63	1000
27.1	0.266	0.186	0.07	1.69	784
28.2	0.031	0.038	0.011	1.74	80
29.1	0.193	0.12	0.032	1.83	644
30.1	0.282	0.203	0.09	1.70	768

Puede observarse en el cuadro 5 que se obtuvo una cantidad apreciable de ADN, así mismo la razón A260/A280 indicó que la pureza de algunas de las muestras respecto a concentración de proteínas fue la adecuada, pues la mayoría cayó dentro del rango indicado: 1.8-2.0. Sin embargo la mayoría de las muestras presentaron una razón menor a 1.8 indicando cierta contaminación por proteínas. Ninguna muestra presentó una razón mayor a 2.0 indicando que ninguna presentó contaminación por cloroformo.

Para evaluar la calidad del ADN extraído se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% para algunas muestras representativas. En la figura 8 se muestra la fotografía del gel obtenido:

Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa al 1% para muestras de ADN representativas obtenidas mediante el protocolo de extracción de ADN.



Pozos 12 y 24: 6 ul de marcador molecular 1 Kb (Promega, Madison, WI) Pozos 1-11, 13-23: 6ul de productos de extracción de muestras.

Puede observarse en el gel que mediante el protocolo de extracción utilizado se obtuvo una cantidad apreciable de ADN de múltiples tamaños, indicando que el método de extracción proporciona un rendimiento apreciable pero no ADN íntegro. Adicionalmente no se observa presencia de ARN.

Debido a que para la técnica no es necesario utilizar ADN estrictamente puro e íntegro y a que la razón obtenida no fue demasiado baja se decidió que el método de extracción sí

proporcionó ADN en suficiente rendimiento y pureza para ser utilizado para la amplificación por PCR.

B. Optimización de la técnica de PCR

Inicialmente se optimizaron las condiciones generales de la reacción utilizándose como base a los protocolos de PCR obtenidos del Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY) (Protocolo #1) y por el CIRAD (Protocolo#2). A continuación se detallan ambos protocolos:

Cuadro 6. Programas de PCR base utilizados para la optimización.

Protocolo #1		Protocolo #2	
94°C	5 min	94°C	5 min
94°C	30 s	94°C	30 s
58°C	1 min	51°C	1 min
72°C	1 min	72°C	1 min
Repetir	35 ciclos	Repetir	35 ciclos
72°C	30 min	72°C	30 min
4°C	Hola	4°C	Hola

Utilizándose para estos programas de PCR las siguientes concentraciones finales:

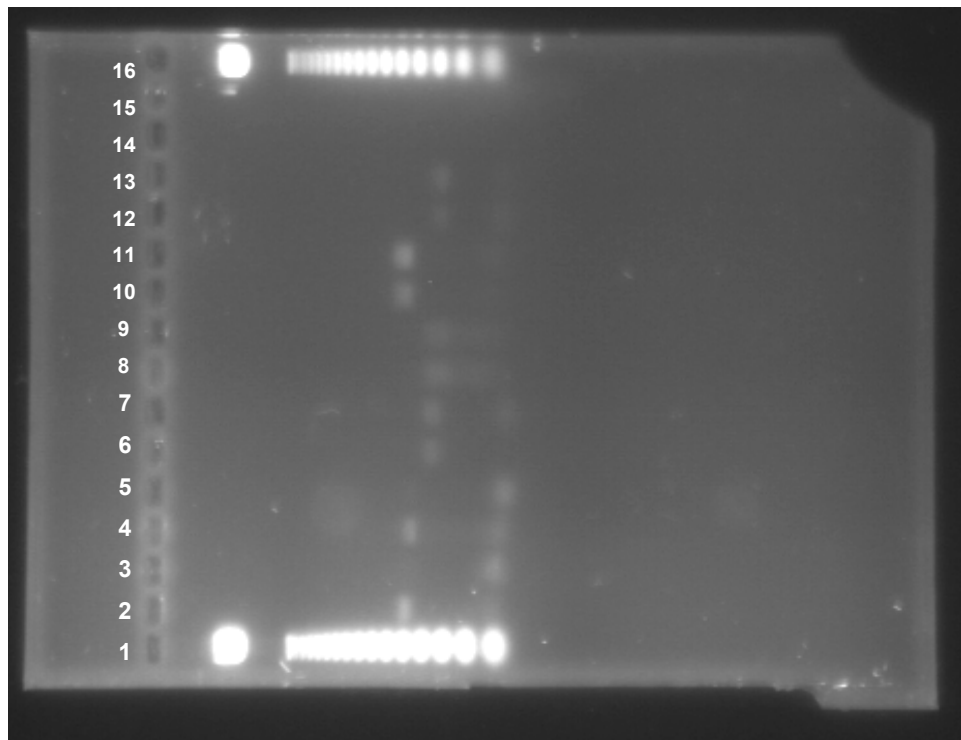
Cuadro 7. Concentración final base de cada reactivo utilizado en la optimización de PCR

Protocolo #1		Protocolo #2	
Tampón	1X	Tampón	1X
MgCl ₂	1mM	MgCl ₂	2Mm
dNTP's	0.05mM c/u	¹ dNTP's	0.2mM c/u
Primer F	0.5uM	⁴ Primer F	0.2uM
Primer R	0.5uM	⁴ Primer R	0.2uM
Taq polimerasa	1 U	Taq polimerasa	1 U
ADN	100ng	⁵ ADN	25ng
Volumen Total	20ul	Volumen Total	25ul

Ambos protocolos presentaron en gel de agarosa productos inespecíficos de tamaño molecular muy bajo, incluyendo el control negativo, indicando que era necesario optimizar las condiciones de la reacción.

Se realizaron varias pruebas variándose la concentración de cloruro de magnesio, de iniciadores, la temperatura de iniciación, la concentración de muestra, la concentración de dNTP's y el número de ciclos, visualizándose los productos en geles de agarosa. El programa y protocolo que presentó al producto de tamaño esperado para los catorce microsatélites se muestra en la sección de métodos. En la figura 8 se muestra a manera de ejemplo los productos obtenidos para seis microsatélites (A3, B6, C12, E2, H4 y H7). Puede observarse que cada iniciador presenta un tamaño de producto diferente que corresponde con el tamaño de producto esperado.

Figura 9. Productos de PCR de optimización en electroforesis de agarosa para muestras representativas con microsatélites A3, B6, C12, E2, H4 y H7



Pozos 1,16: Marcador molecular 50bp (Promega, Madison, WI). Pozo 2,3: A9. Pozo 4,5: B6. Pozo 6,7: C12. Pozo 8,9: E2. Pozo 10,11: H4. Pozo 12,13: H7. Pozo 14, 15: Control negativo

Como se puede observar, en la electroforesis en agarosa la amplificación de cada microsatélite no permite identificar el tamaño de cada alelo de la secuencia microsatélite, sino sólo se presenta una banda gruesa. Debido a que para este estudio es necesario identificar el tamaño de cada alelo y determinar si los individuos son homocigotos o heterocigotos para cada microsatélite, fue necesario utilizar un tipo de electroforesis que proporcionara una alta resolución y sensibilidad como lo es la electroforesis en geles de secuenciación desnaturizantes utilizando tinción de plata. Esta técnica permite separar los fragmentos de ADN con muy alta resolución debido a la gran distancia que recorre la muestra a lo largo del gel, además de utilizar el alto poder de resolución de la poliacrilamida, por ello fue posible separar fragmentos de hasta 1 base de diferencia. La alta sensibilidad del método de tinción con plata permitió visualizar con gran precisión la migración de cada fragmento. Las condiciones desnaturizantes empleadas: formamida en el tampón de carga, urea en el gel y la desnaturización de las muestras previo a su carga en el gel permiten que los fragmentos de ADN permanezcan separados unos de otros sin ningún tipo de conformación secundaria, pudiéndose determinar con exactitud el tamaño de cada uno de los fragmentos presentes por la amplificación. Para determinar el tamaño exacto de cada fragmento fue necesario contar con datos de migración patrón que permitieran interpolar las migraciones de cada fragmento, por ello se utilizó un marcador de tamaño de 50 pares de bases que contiene fragmentos que

van desde 50 a 800 pares de bases. Adicionalmente se utilizó controles de cocoteros altos del pacífico (WAT) y enanos malayos amarillos (MYD) cuyos tamaños de alelos son conocidos. Estos controles fueron utilizados tanto como prueba de una amplificación exitosa como punto de comparación del tamaño de los fragmentos obtenidos.

En el anexo A se presentan las fotografías de los geles de secuenciación realizados, un gel para dos microsatélites. En ellas puede observarse la presencia de una sola banda para individuos homocigotos y de dos bandas para individuos heterocigotos. En algunos casos se presentaron bandas de fondo alrededor de la banda principal que son producto de lo que se conoce como “replication slippage” en inglés. Este evento sucede tanto en forma natural durante la replicación de ADN como en la amplificación por la enzima taq polimerasa, leyéndose como banda principal la banda con mayor intensidad y definición.

C. Tamaños y frecuencias alélicas de los individuos de la población

Los 29 individuos de la población amplificaron con PCR las catorce secuencias microsatélites pudiéndose determinar la composición y tamaño de alelos por cada microsatélite trabajado. Ello es importante porque indica que no existe la presencia de alelos nulos. Los alelos nulos son causados por una mutación en el sitio de unión del iniciador que da como resultado un alelo que no será amplificado. La presencia de dichos alelos nulos puede llevar a una observación falsa de exceso de homocigotos, que indicaría que la población no está en equilibrio de Hardy-Weinberg. En este caso la ausencia de alelos nulos para los catorce microsatélites indica que se cumple una de las suposiciones principales para poder realizar el análisis de datos. Lo anterior concuerda con lo esperado ya que se utilizaron cebadores previamente diseñados y utilizados en estudios tanto en el CICY y CIRAD para determinar el polimorfismo que existe en el tamaño de secuencias microsatélites para cocoteros.

En el cuadro 8 y 9 y figuras 18 a 31 (en anexo C) se presentan las frecuencias de alelos obtenidos para la población para los 14 microsatélites. Se muestran las frecuencias totales calculadas, que incluyen todos los individuos, es decir son frecuencias absolutas. Estas fueron obtenidas dividiendo el número encontrado para un alelo determinado dentro del número total de alelos observados para el microsatélite en cuestión. Estas gráficas muestran cualitativamente el grado de polimorfismo, de cada locus, siendo el más polimórfico el locus A3 y el menos polimórfico el locus E2. Se define como locus polimórfico al locus con dos alelos o más. Todos los locus estudiados fueron polimórficos, tal y como se esperaba, ya que la selección de los marcadores microsatélites se basa en su grado de polimorfismo. La razón por la cual existe un microsatélite más frecuente que los demás aún no se conoce, pero se cree que podría deberse a un “cuello de botella” que ocurrió hace mucho tiempo (Eisen 1999). Después de esta selección se asumiría que sobrevivieron mayormente los individuos con el microsatélite más frecuente y que de éste se derivaron todos los demás.

En la figura 32 se presenta a manera de resumen las frecuencias de los alelos de la población para los catorce microsatélites.

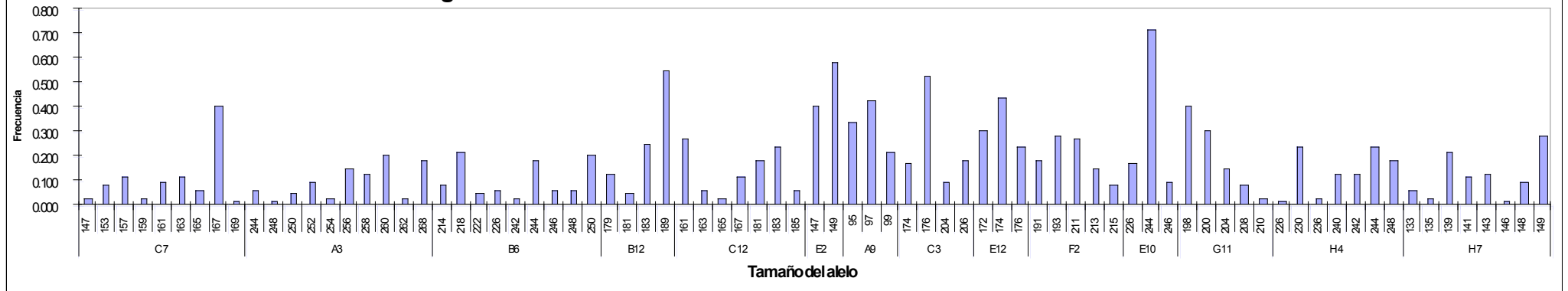
Cuadro 8. Frecuencias de alelos obtenidos con los catorce microsatélites

Microsatélite	Alelo	Frecuencia
A3	244	0.069
	248	0.017
	250	0.052
	252	0.103
	254	0.034
	256	0.155
	258	0.138
	260	0.207
	262	0.034
268	0.190	
A9	95	0.345
	97	0.431
	99	0.224
B6	214	0.086
	218	0.224
	222	0.052
	226	0.069
	242	0.034
	244	0.190
	246	0.069
	248	0.069
250	0.207	
B12	179	0.138
	181	0.052
	183	0.259
	189	0.552
C3'	174	0.172
	176	0.534
	204	0.103
	206	0.190
C7	147	0.034
	153	0.086
	157	0.121
	159	0.034
	161	0.103
	163	0.121
	165	0.069
	167	0.414
169	0.017	
C12	161	0.276
	163	0.069
	165	0.034
	167	0.121
	181	0.190
	183	0.241
E2	185	0.069
	147	0.414
	149	0.586

Cuadro 9. Frecuencias de alelos obtenidos con los catorce microsatélites (continuación)

Microsatélite	Alelo	Frecuencia
E10	226	0.172
	244	0.724
	246	0.103
E12	172	0.310
	174	0.448
	176	0.241
F2	191	0.190
	193	0.293
	211	0.276
	213	0.155
	215	0.086
G11	198	0.414
	200	0.310
	204	0.155
	208	0.086
	210	0.034
H4	226	0.017
	230	0.241
	236	0.034
	240	0.138
	242	0.138
	244	0.241
	248	0.190
H7	133	0.069
	135	0.034
	139	0.224
	141	0.121
	143	0.138
	146	0.017
	148	0.103
	149	0.293

Figura 32. Frecuencia de alelos de los catorce microsátélites



C. Análisis estadístico

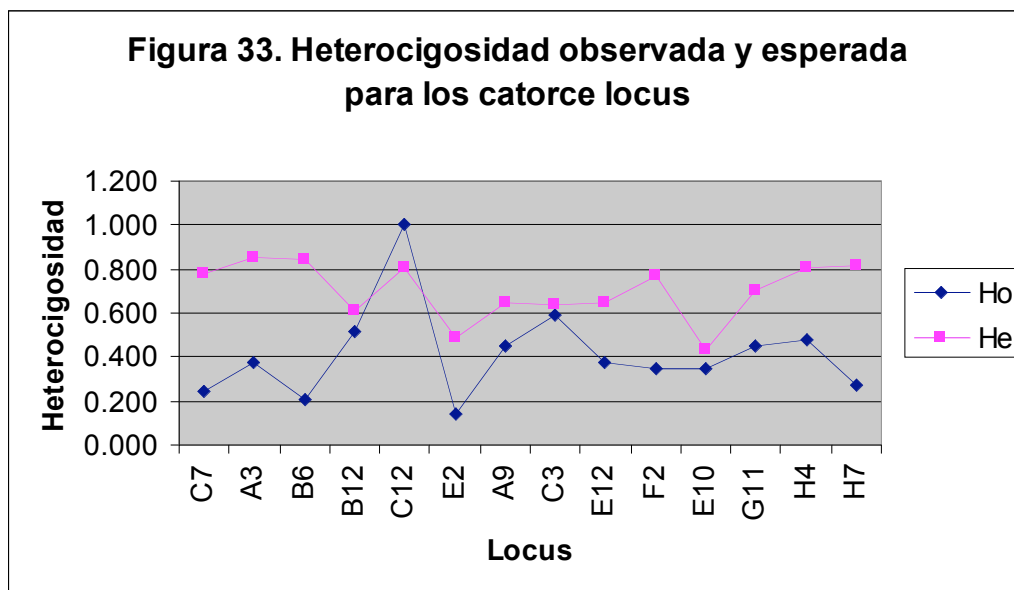
Se utilizó el programa GenAlex6 para determinar el número efectivo de alelos, la heterocigocidad observada y esperada y el índice de fijación. Con el mismo programa se realizó una prueba de chi cuadrado (χ^2) para comparar el número de heterocigotos esperados y observados, calculándose la probabilidad (P) para determinar la existencia del equilibrio de Hardy-Weinberg. Se calculó también la distancia e identidad de Nei para establecer la relación entre la población estudiada y las poblaciones control de cocoteros altos y enanos.

El cuadro 10 muestra las estadísticas de diversidad genética calculadas para la población. El número de alelos fue calculado por conteo directo, variando desde 1 hasta N, en donde N es el tamaño de la muestra. Como ya se había mencionado anteriormente, el locus A3 presentó el mayor número de alelos (siendo el más polimórfico), mientras que el locus E2 presentó el menor número (siendo el menos polimórfico). El número efectivo de alelos permite realizar una comparación de la diversidad alélica de diferentes loci con distribuciones de frecuencia diferentes, proveyendo un estimado del número de alelos igualmente frecuentes en una población ideal con homocigosidad equivalente a la población en estudio (Beatty and Marquardt 1996). En la figura 33 se presenta la heterocigosidad esperada y la observada para los catorce locus. Tanto en la figura 33 como en el cuadro 8 es posible observar que la heterocigosidad observada fue para todos los locus, excepto el locus C12, menor a la heterocigosidad esperada. Respecto al índice de fijación, todos los valores obtenidos, excepto para el locus C12, fueron positivos indicando que la población estudiada no se reproduce aleatoriamente sino que existe endogamia. Los coeficientes de endogamia entre individuos relativos a la población son en este caso iguales al índice de fijación por tratarse de individuos bajo una misma población y no individuos en subpoblaciones. El promedio de los coeficientes de endogamia fue igual a 0.400, un valor sustancialmente positivo que indica que la población no se reproduce aleatoriamente, sino que existe endogamia. La endogamia se refiere a la reproducción entre parientes, en el caso de los cocoteros, puede referirse también a la autopolinización. Esta endogamia en los cocoteros es el resultado tanto de la habilidad limitada de dispersarse como de la autopolinización, que aunque en cocoteros altos es menor que en cocoteros enanos, es aún significativa. La endogamia lleva a un exceso de homocigotos, por ello en la población se observó una heterocigosidad reducida en todos los locus, excepto uno.

Cuadro 10. Diversidad genética para cada locus en la población

Locus	N	Na	Ne	Ho	He	F
C7	29	9.000	4.426	0.241	0.774	0.688
A3	29	10.000	7.008	0.379	0.857	0.558
B6	29	9.000	6.469	0.207	0.845	0.755
B12	29	4.000	2.545	0.517	0.607	0.148
C12	29	7.000	5.112	1.000	0.804	-0.243
E2	29	2.000	1.942	0.138	0.485	0.716
A9	29	3.000	2.817	0.448	0.645	0.305
C3	29	4.000	2.762	0.586	0.638	0.081
E12	29	3.000	2.813	0.379	0.644	0.411
F2	29	5.000	4.358	0.345	0.771	0.552
E10	29	3.000	1.771	0.345	0.435	0.208
G11	29	5.000	3.331	0.448	0.700	0.359
H4	29	7.000	5.207	0.483	0.808	0.403
H7	29	8.000	5.357	0.276	0.813	0.661

N= número de individuos en la población, Na= número de alelos, Ne= número efectivo de alelos, Ho= heterocigicidad observada, He= heterocigicidad esperada, F= índice de fijación.



Con el objetivo de determinar si la población se encuentra en equilibrio es decir, genéticamente aislada, se realizó el análisis de Hardy-Weinberg. El planteamiento de Hardy-Weinberg resume los factores responsables de los cambios en las frecuencias génicas de cualquier población: reproducción no aleatoria, tamaño de la población, migración, mutaciones, selección natural, flujo de genes y barreras biológicas. Se pueden examinar las frecuencias de genotipos para determinar si una población se encuentra en equilibrio de Hardy-Weinberg. Este equilibrio puede verse como una hipótesis nula acerca de los factores antes enumerados. Si cualquiera de ellos afecta significativamente las frecuencias, la población no estará en equilibrio (Beatty and Marquardt 1996).

Mediante el análisis estadístico, por medio de la heterocigosidad observada comparada con la heterocigosidad esperada y principalmente a través del índice de fijación F y coeficiente de endogamia, se determinó que la población no se reproduce al azar. Por ello, se esperaba que la población no se encontrara en equilibrio de Hardy-Weinberg. Para evaluar si la población está en equilibrio se utilizó la probabilidad de la prueba de chi-cuadrado. Si la probabilidad de obtener el valor observado de chi cuadrado (dado los grados libertad) es mayor a 0.05, el resultado no es estadísticamente significativo y se acepta la hipótesis nula (la población se aparea al azar). Si la probabilidad de obtener el valor observado de chi cuadrado es menor a 0.05, el resultado es estadísticamente significativo, se rechaza la hipótesis nula (la población se aparea al azar) y se acepta la hipótesis alternativa (la población no se aparea al azar). En el cuadro 11 se presentan los valores de la prueba obtenidos para cada locus, así como los grados de libertad y si la población se encontró en equilibrio. Como puede observarse la población no está en equilibrio para ninguno de los catorce marcadores microsatélites tal y como se esperaba. Dada la endogamia que presentó la población, no es posible utilizando únicamente esta prueba, determinar si la población se encuentra efectivamente genéticamente aislada. Sin embargo la elección de esta población se realizó debido a su aislamiento geográfico de otras poblaciones de cocoteros, sus características morfológicas y a la ausencia de cocoteros enanos en las cercanías, por ello podría considerarse que la falta de equilibrio se debe a la reproducción no aleatoria encontrándose la población aislada genéticamente.

Cuadro 11. Análisis de Hardy-Weinberg para cada locus

Locus	Grados de libertad	Chi-cuadrado	Probabilidad	Equilibrio
C7	36	116.835	0.000	Negativo
A3	45	145.212	0.000	Negativo
B6	36	195.473	0.000	Negativo
B12	6	20.247	0.003	Negativo
C12	21	112.634	0.000	Negativo
E2	1	14.854	0.000	Negativo
A9	3	10.990	0.012	Negativo
C3	6	37.721	0.000	Negativo
E12	3	11.652	0.009	Negativo
F2	10	50.166	0.000	Negativo
E10	3	30.644	0.000	Negativo
G11	10	52.719	0.000	Negativo
H4	21	72.152	0.000	Negativo
H7	28	120.870	0.000	Negativo

Finalmente, para determinar si la población se encuentra genéticamente más cercana a una población de cocoteros altos que a una población de cocoteros enanos, se calculó la distancia e identidad genética de Nei. El criterio de este análisis indica que la identidad es igual a uno si las poblaciones son más parecidas. La distancia genética indica que entre más cercano a cero sean los resultados, más relacionadas están las poblaciones entre sí. En el cuadro 12 y 13 se muestran los valores obtenidos para la distancia e identidad de Nei

respectivamente para población estudiada en relación a las poblaciones control de cocoteros altos y enanos. Es importante destacar que los cocoteros utilizados como control fueron elegidos con base a sus características morfológicas, comparándose el patrón alélico obtenido con el patrón de cocoteros enanos y altos puros el cual ha sido reportado por Perera, *et. al.* (2000). Todos los cocoteros utilizados como control, tanto los enanos como los altos, presentaron el patrón esperado para los catorce marcadores microsatélites. Por lo que, tanto sus características morfológicas como su patrón alélico corresponde a la de cocoteros enanos y altos puros, permitiéndoles ser utilizados como control para la comparación de la población “Maravillas”. En cuanto a la distancia genética obtenida, puede observarse que la población “Maravillas” se encuentra genéticamente más cercana a la población de cocoteros altos, esta relación puede observarse más claramente en la figura 34, en donde se presenta un dendrograma que relaciona a la población en estudio con las poblaciones controles. La identidad genética de Nei comprueba esta relación pues puede observarse que la población “Maravillas” es más parecida a los cocoteros altos que a los cocoteros enanos.

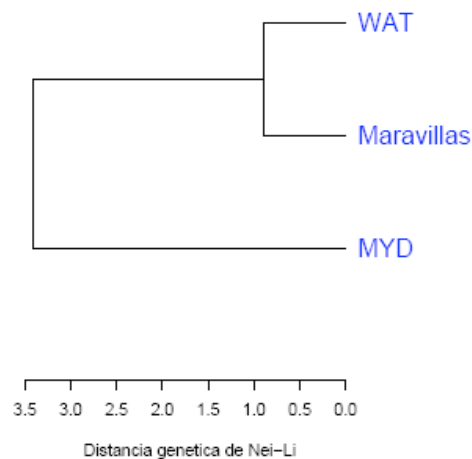
Cuadro 12. Distancia de Nei para la población Maravillas en relación a controles altos y enanos

Maravillas	Altos	Enanos	
0.000			Maravillas
0.898	0.000		Altos
2.051	3.401	0.000	Enanos

Cuadro 13. Identidad de Nei para la población Maravillas en relación a controles altos y enanos

Maravillas	Altos	Enanos	
1.000			Maravillas
0.407	1.000		Altos
0.129	0.033	1.000	Enanos

Figura 34. Dendrograma que muestra la relación entre la población estudiada y los controles altos (WAT) y enanos (MYD)



Es importante destacar que el estudio se realizó con base a una caracterización genética y no morfológica debido a que esta última se encuentra altamente influenciada por factores ambientales y no es por lo tanto exacta, sin embargo podría complementarse el estudio con una caracterización morfológica que podría proveer información complementaria. La evaluación de diversidad fenotípica y molecular facilitaría la formulación de estrategias de conservación para identificar poblaciones que representen colecciones con el germoplasma completo para conservación tanto *ex situ* como *in situ*.

IV. CONCLUSIONES

- Se comprobó que el método utilizado: técnica de extracción de ADN, amplificación por PCR con los catorce iniciadores y electroforesis en gel de secuenciación sí permite detectar el tamaño de secuencias microsatélites para cocoteros, pudiéndose utilizar con confianza para el estudio de genética de poblaciones de cocoteros.
- Se determinó que el locus más polimórfico fue el locus A3 y el menos polimórfico el locus E2.
- Todos los locus estudiados fueron polimórficos, tal y como se esperaba, ya que la selección de los marcadores microsatélites se basa en su grado de polimorfismo.
- El promedio de los coeficientes de endogamia indicó que la población no se reproduce aleatoriamente, sino que existe endogamia, resultado tanto de la habilidad limitada de dispersarse como de la autopolinización en los cocoteros.
- La heterocigosidad observada fue para todos los locus, excepto el locus C12, menor a la heterocigosidad esperada debido al exceso de homocigotos producto de la endogamia en la población.
- Se determinó que la población no está en equilibrio para ninguno de los catorce marcadores microsatélites dada la endogamia que presentó la población.
- Se determinó con base al aislamiento geográfico de otras poblaciones de cocoteros, sus características morfológicas y a la ausencia de cocoteros enanos en las cercanías, que la población “Maravillas” no está en equilibrio debido únicamente a la reproducción no aleatoria, por lo que puede considerarse que la población sí se encuentra aislada genéticamente.
- Tanto la distancia como la identidad genética de Nei obtenidas, indican que la población “Maravillas” se encuentra genéticamente más cercana y es más parecida a la población de cocoteros altos que a los cocoteros enanos.
- Debido a que la población “Maravillas” se puede considerar genéticamente aislada y a que se encuentra más cercana a los cocoteros altos, podría presentar resistencia al ALC, por ello es una buena candidata para utilizarse para producción de semillas certificadas que podrían ser utilizadas para pruebas de resistencia al ALC en el Atlántico.

V. RECOMENDACIONES

- En cuanto a la metodología, se recomienda intentar correr más de una muestra por pozo en la electroforesis en gel de secuenciación, utilizándose dos microsatélites que presenten alelos de tamaño muy diferente, de modo que se procesen más muestras por corrida reduciéndose la cantidad de geles a realizarse.
- Se recomienda complementar el estudio utilizándose una caracterización fenotípica.
- Debido a que la exactitud de los parámetros estadísticos realizados aumenta con el número de muestra, se recomienda si es posible aumentar el número de cocoteros muestreados por cada población.
- Se recomienda que la población “Maravillas” sea utilizada para producción de semillas certificadas que podrían ser utilizadas para pruebas de resistencia al ALC en el Atlántico.

VI. LITERATURA CITADA

- Arellano, J. y C. Oropeza. 1995. *Letal Yellowing*. En *Lethal Yellowing: Research and Practical Aspects* (Oropeza, C.; F. W. Howard; G. R. Ashburner, eds.). Kluwer Academic Publishers. The Netherlands. Pp. 1-15
- Beaty, B.J and C.W. Marquardt. 1996. *The Biology of disease Vectors*. University Press of Colorado. USA. Pp 417-437.
- Been, B. O. 1995. *Integrated pest management for the control of lethal yellowing: quarantine, cultural practices and optimal use of hybrids*. En *Lethal Yellowing: Research and Practical Aspects* (Oropeza, C.; F. W., Howard; G. R., Ashburner, eds.). Kluwer Academic Publishers. The Netherlands. Pp. 101-109
- Brown, S.; A. Szewc-Mcfadden y S. Kresovich. 1996. *Development and application of simple sequence repeat (SSR) loci for plant genome analysis*. En *Methods of genome analysis in plants*. (Prem P. y CRC., Jauhar, eds.) Press, Inc. Pp 147-158.
- Bryan, G.; A. Collins; P. Stephenson; A. Orry; J. Smith y M. Gale. 1997. *Isolation and identification of microsatellites from hexaploid bread wheat*. *Theoretical and Applied Genetics* 94(5):557-563.
- Claros Díaz, M.G. 2000. *Marcadores moleculares: Qué son, cómo se obtienen y para qué valen*. Dpto. de Biología Molecular y Bioquímica. Universidad de Málaga. Webpage <http://www.encuentros.uma.es/encuentros49/marcadores.html>. Última fecha de acceso: 2006.
- Chambers, G. y E. MacAvoy. 2000. *Microsatellites: consensus and controversy*. *Comparative Biochemistry and Physiology Parte B* 126:455-476.
- Cho, Y.G.; T. Ishii; S. Temnykh; X. Chen; L. Lipovich; S.R. McCouch; S.N. Ayres y S. Cartinhour. 2000. *Diversity of microsatellites derived from genomic libraries and GenBank sequences in rice (Oryza sativa L.)* *Theoretical and Applied Genetics* 100(5):713-722.
- Curtis, H. y N.S. Barnes. 1989. *Biology*. 5th ed. Worth publishers. USA. Pp 346-370.
- Dávila, J.; Y. Loarce y E. Ferrer. 1999. *Molecular characterization and genetic mapping of random amplified microsatellite polymorphism in barley*. *Theoretical and Applied Genetics* 98:265-273.

- Davis, R. E. y W. A. Sinclair. 1998. *Phytoplasma identity and disease etiology*. *Phytopathology* 88(12):1372-1376.
- Doyle, J. J. y J.L Doyle. 1990. *Isolation of plant DNA from fresh tissue*. *Focus* 12:13-15
- Dowling, T. E.; C. Moritz; J. D. Palmer y L.H. Rieseberg. 1993. *Nucleic acids III: Analisis of fragments and restriction sites* Chapt. 8. En *Molecular Systematics* (Hills, D. M.; C., Moritz y B.K., Mable, eds). 2nd ed. Sinauer Associates. USA. 655 pp.
- Eden-Green, S. J. 1995. *A brief history of lethal yellowing*. En *Lethal Yellowing: research and practical aspects* (Oropeza, C.; F.W. Howard y G.R. Ashburner, eds.). Kluwer Academic Publishers. The Netherlands. Pp. 17-31
- Harries, H. C. 2001. *The Coconut Palm (Cocos nucifera)*. Chapt. 12. En: F.T. Last (ed) *Tree Crop Ecosystems*. Elsevier, Netherlands. Pp. 321-338
- Hartl, D.L. 1988. *A primer of Population Genetics*. 2nd. Ed. Sinauer associates. USA. Pp 27-70.
- Hartl, D.L y A.G. Clark. 1989. *Principles of population Genetics*. 2nd ed. Sinauer Associates. USA. Pp 136-287.
- Howard, F. W. y N.A Harrison. 2000. *Lethal Yellowing of Palms*. University of Florida. USA. Webpage en <http://www.ftld.ufl.edu/lyfacts.htm>. Última fecha de acceso: 2006.
- Hoy, M. A. 1994. *Insect Molecular Genetics: An introduction to principles and applications*. 1st ed. Academic Press. USA. Pp. 546
- Jarne, P. y P., Lagoda. 1996. *Microsatellites, from molecules to populations and back*. *Trends in Ecology and Evolution* 11(10):424-429.
- Mba, C.; P. Stephenson; K. Edwards; S. Melzer; J. Nkumbira; U. Gullberg; K. Apel; M. Gale; J. Tohme y M. Fregene. 2001. *Simple sequence repeat (SSR) markers survey of the cassava (Manihot esculenta Crantz) genome: towards an SSR-based molecular genetic map of cassava*. *Theoretical and Applied Genetics* 102(1):21-31.
- Mettler, L.E.; T.G. Gregg y H.E. Schaffer. 1988. *Population Genetics and Evolution*. 2nd ed. Prentice Hall. USA. Pp 254-270.

- Milbourne, D.; R. Meyer; A. Collins; L. Ramsay; C., Gebhardt y R., Waugh. 1998. *Isolation, and mapping of simple sequence repeat loci in potato*. Molecular and General Genetics 259(3):233-245.
- Morgante, M. y A.M Olivieri. 1993. *PCR-amplified microsatellites as markers in plants*. The Plant Journal 3(1): 175-182.
- Moxon, E. y C., Willis. 1999. *DNA microsatellites: agents of evolution?*. Scientific American. Pp 94-99.
- Rossetto, M.; A. McLauchlan; F. Harriss; R. Henry; P. Baverstock; L. Lee; T. Maguire y K. Edwards. 1999. *Abundance and polymorphism of microsatellite markers in the tea tree (Melaleuca alternifolia, Myrtaceae)* Theoretical and Applied Genetics 98(6): 1091-1098.
- Parrotta, J. A. 1993. *Cocos nucifera L. Coconut, coconut palm, palma de coco*. U.S. Department of agriculture, forest service. USA. 7pp.
- Peakall, R. y P.E. Smouse. 2006. *GENALEX 6: genetic analysis in Excel*. Population genetic software for teaching and research. Molecular Ecology Notes. 6: 288-295.
- Perera, L.; J. R. Russell; J. Provan y W. Powell. 2000. *Use of microsatellite DNA markers to investigate the level of genetic diversitu and population genetic structure of coconut (Cocos nucifera L.)* Genome 43: 15-21.
- Powell, W.; M. Morgante; C. Andre; M. Hanafef; J. Vogel; S. Tingey y A. Rafalski. 1996. *The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germoplasm analysis*. Mol Breed 2: 225-238.
- Schlotterer, C y D. Tautz. 1992. *Slippage synthesis of simple sequence DNA*. Nucleic Acids Research 20(2):211-215.
- Tabachnick, W.J. y W.C Black IV. 1996. "Population genetics in vector biology". Chap 25 in: Beaty, B.J y C.W., Marquardt. *The Biology of disease vectors*. University Press of Colorado. USA. Pp 417-437.
- Tautz, D. 1989. *Hypervariability of simple sequence as a general source for DNA markers*. Nucleic Acids Res 17:463-471.

- Tubsón, F. 2000. *Caracterización de microsatélites de Solanum tuberosum y en las otras especies de papa cultivada*. Tesis para optar al título de Biólogo. Facultad de Ciencias Biológicas. Lima, UNMSM.
- Yáñez Amayo, V.C Orlando. 2002. *Aislamiento y caracterización de marcadores moleculares microsatélites a partir de la construcción de librerías genómicas enriquecidas de camote (Ipomoea batatas (L.) Lam.)* Tesis para optar al título de Biólogo. Facultad de Ciencias Biológicas. Lima, UNMSM.
- Zane, L.; L. Bargelloni y T. Patarnello. 2002. *Strategies for microsatellite isolation: a review*. *Molecular Ecology* 11:1-16.
- Zizumbo, D. y J. Arellano. 1995. *Coconut variation and genetic resources*. En *Lethal Yellowing: research and practical aspects* (Oropeza, C.; F.W., Howard y G.R., Ashburner. eds.). Kluwer Academic Publishers. The Netherlands. Pp. 123-138
- Zizumbo-Villarreal, D.; F. Hernández-Roque y C. Harries. 1993. *Coconut Varieties in México*. *Economic Botany* 47(1):65-78
- Zizumbo-Villarreal, D.; M. Fernández y R. Cárdena. 1998. *Memorias de la Primera Reunión Nacional de Palma de coco*. SAGAR-Gob. Edo. Guerrero-Fundación Guerrero Produce-INIFAP. Pp. 87-98
- Zizumbo-Villarreal, D. y D. Piñero. 1998. *Pattern of Morphological Variation and Diversity of Cocos nucifera (Arecaceae) in México*. *American Journal of Botany* 85(6):855-865.
- Zizumbo-Villarreal, D. y H. J. Quero. 1998. *Re-Evaluation of Early Observations on Coconut in the New World*. *Economic Botany* 52(1): 68-77.

ANEXOS

A. Fotografías de los geles de secuenciación de todas las secuencias microsatélites

Figura 10. Gel de secuenciación microsatélites G11-H4



Figura 11. Gel de secuenciación microsatélite H7



Figura 12. Gel de secuenciación microsatélites A9-C3'



Figura 13. Gel de secuenciación microsatélite E10



Figura 14. Gel de secuenciación microsatélite E12-F2

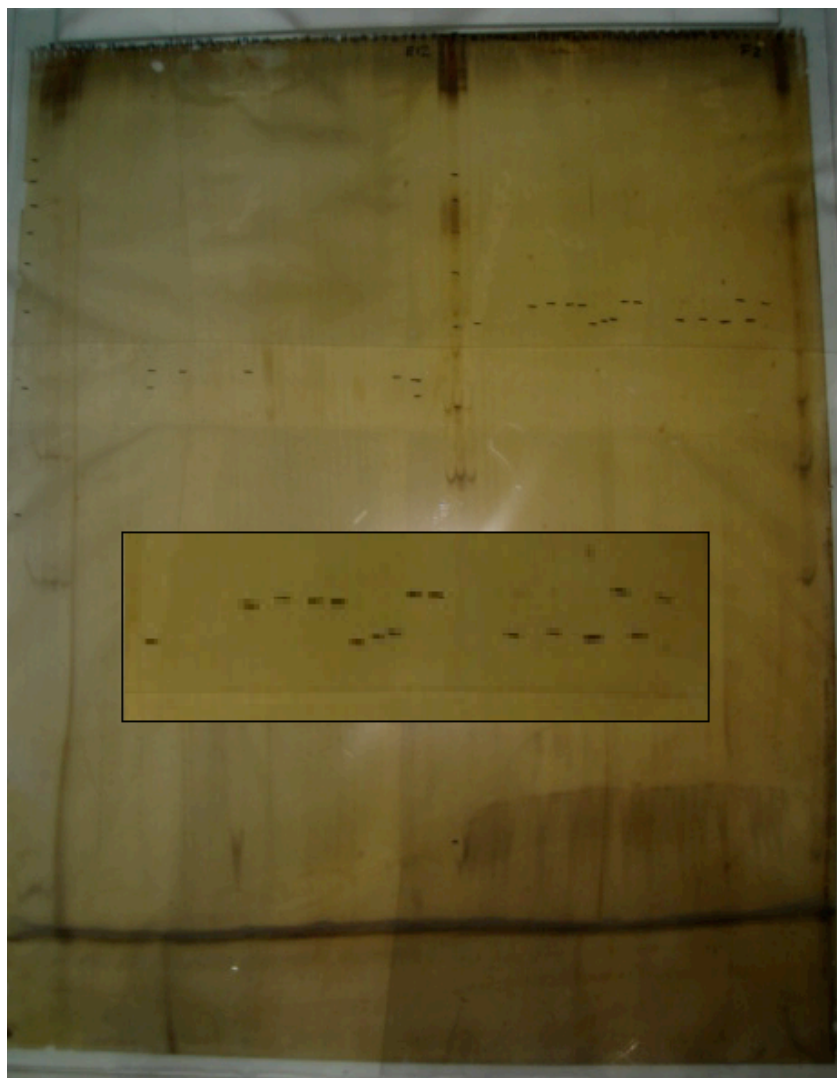


Figura 15. Gel de secuenciación microsatélites C12-E2



Figura 16. Gel de secuenciación microsatélites B6-B12

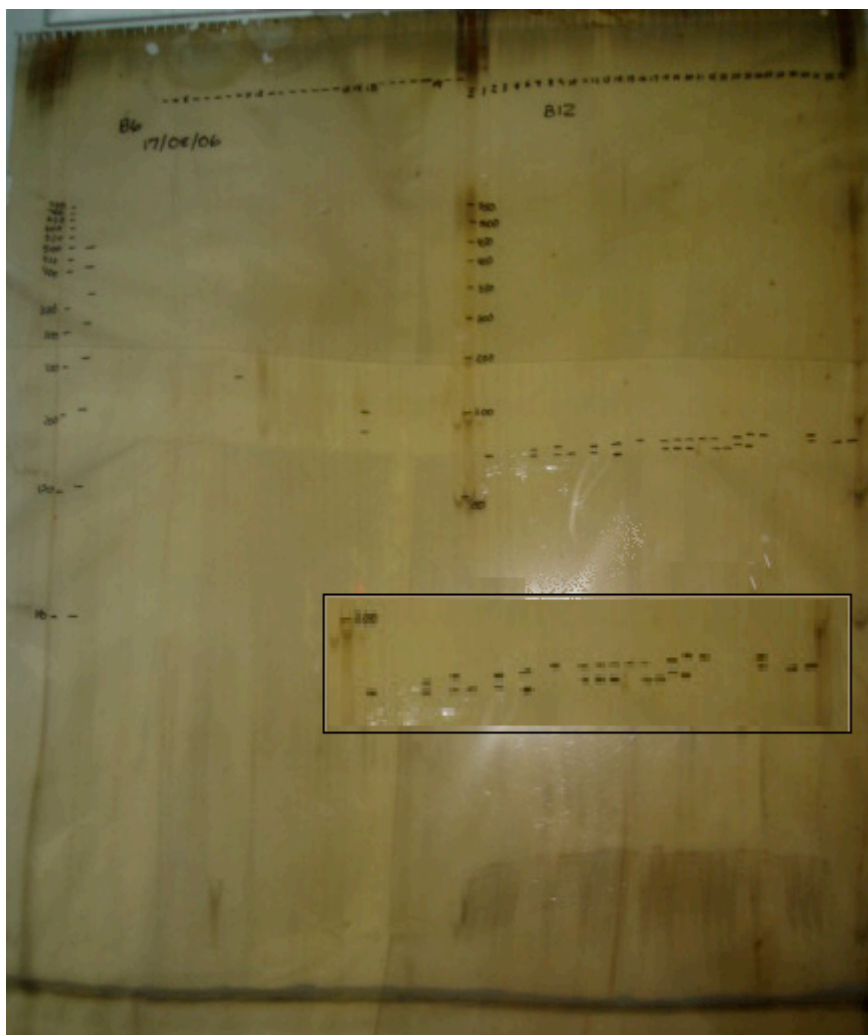
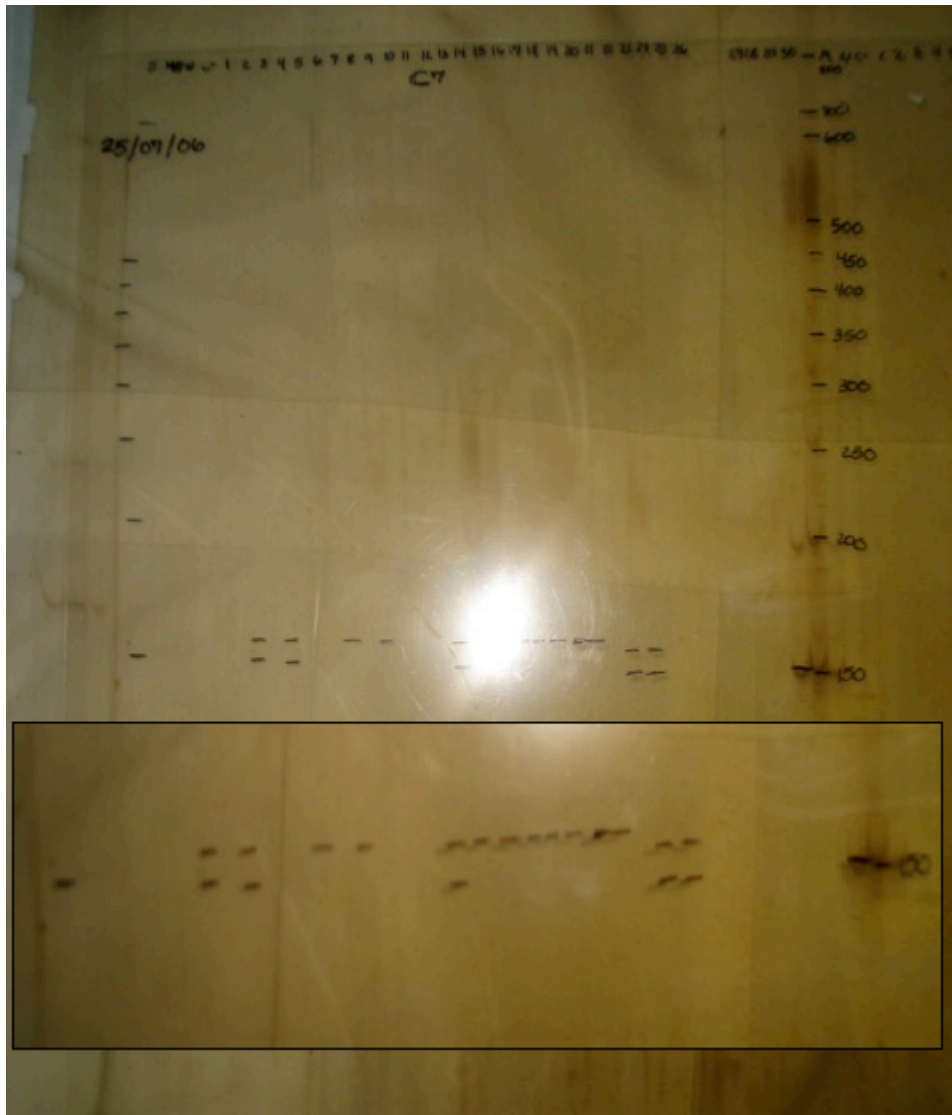


Figura 17. Gel de secuenciación microsatélite C7



B. Tamaño de alelos para las catorce secuencias microsatélites

Cuadro 14. Tamaño de los dos alelos para las catorce secuencias microsatélites: C7, A3, B6, B12, C12, E2, A9, C3', E12, F2, E10, G11, H4 y H7

Muestra		C7		A3		B6		B12		C12		E2		A9
1.1	163	163	260	260	246	246	183	179	167	183	147	147	97	95
2.1	161	161	260	268	248	248	179	179	163	185	149	149	95	95
3.1	159	167	260	268	250	250	189	183	163	185	147	149	97	97
4.1	163	147	260	260	250	250	189	183	161	183	149	149	97	97
6.1	159	167	260	268	214	244	189	189	167	183	147	147	95	95
7.1	163	163	268	268	222	214	183	179	167	183	149	149	95	95
8.1	167	167	256	250	246	246	189	189	167	183	147	147	95	97
9.1	161	161	260	268	248	248	183	179	167	183	147	147	99	99
10.1	167	167	268	268	218	218	181	181	163	185	149	149	97	99
11.1	169	153	268	268	250	250	189	181	163	185	149	149	97	97
12.1	157	157	252	252	250	250	179	179	161	183	147	147	95	95
13.1	167	167	260	268	218	218	189	179	165	183	147	147	97	99
14.1	167	167	258	258	250	250	189	183	161	183	149	149	97	99
15.1	167	167	262	258	214	244	189	189	161	183	149	149	97	99
16.1	167	167	262	258	222	214	189	189	165	183	149	149	97	99
17.1	167	167	260	260	222	214	189	183	161	181	149	149	95	95
18.1	167	167	256	256	218	218	189	183	161	181	149	149	95	97
19.1	167	167	252	252	250	250	189	183	161	181	149	149	95	97
20.1	167	167	260	250	218	218	189	189	161	181	149	149	95	95
21.1	167	167	252	252	218	218	189	183	161	181	149	149	97	97
22.1	153	153	258	258	244	244	183	183	161	181	149	149	97	97
23.1	161	163	256	250	226	226	189	189	161	181	149	147	99	99
24.1	161	163	244	244	244	244	189	183	161	183	147	149	97	99
25.1	157	147	256	248	226	226	189	183	161	181	147	147	97	99
26.1	153	153	256	256	242	242	189	189	161	181	147	147	95	97
27.1	157	157	244	244	244	244	189	183	161	181	147	149	99	99
28.1	165	165	258	258	244	244	189	189	167	183	147	147	97	97
29.1	165	165	256	256	218	218	189	189	167	183	149	149	95	95
30.1	157	157	254	254	244	218	189	189	161	181	147	147	95	97

Cuadro 15. Tamaño de los dos alelos para las catorce secuencias microsatélites: C7, A3, B6, B12, C12, E2, A9, C3', E12, F2, E10, G11, H4 y H7
(continuación)

Muestra		C3'		E12		F2		E10		G11		H4		H7
1.1	176	206	172	172	211	211	244	226	210	204	248	230	141	141
2.1	176	176	172	172	211	211	244	226	200	200	248	230	143	143
3.1	174	174	172	172	193	193	246	246	208	204	240	240	149	149
4.1	176	176	174	174	215	215	244	244	198	200	248	230	149	149
6.1	176	206	174	174	193	193	244	244	200	200	248	230	149	149
7.1	176	204	174	174	215	215	246	246	200	200	248	230	139	139
8.1	176	176	174	174	213	211	244	244	198	198	240	240	149	146
9.1	174	174	174	174	211	213	244	244	198	198	242	242	139	139
10.1	176	206	174	174	193	191	244	244	198	198	244	244	139	133
11.1	176	204	172	172	211	211	244	244	198	198	248	230	149	149
12.1	176	206	172	172	213	213	244	244	208	204	242	242	149	149
13.1	176	204	172	172	191	193	244	244	204	200	244	244	149	149
14.1	174	174	174	176	213	211	244	226	200	200	244	244	148	148
15.1	176	176	176	176	193	193	244	226	208	204	244	244	143	149
16.1	174	174	174	176	193	191	244	226	198	198	230	226	143	143
17.1	176	176	174	176	213	215	244	226	198	198	240	230	141	141
18.1	176	206	172	174	213	213	244	226	200	200	240	230	148	148
19.1	176	204	174	174	211	211	244	226	198	198	240	230	141	141
20.1	176	176	176	176	191	191	244	244	198	198	244	244	143	143
21.1	176	206	174	176	191	191	244	244	208	204	240	230	143	149
22.1	176	206	176	172	193	193	244	244	204	200	244	244	141	139
23.1	176	204	174	176	191	193	246	246	198	200	244	236	149	149
24.1	176	206	176	176	211	211	244	226	210	204	244	236	135	135
25.1	176	204	172	174	193	193	244	244	200	200	242	242	148	148
26.1	176	206	172	174	193	193	244	244	208	204	248	248	139	139
27.1	174	174	172	174	193	191	244	244	198	200	248	248	139	139
28.1	176	176	172	174	191	191	244	244	198	200	242	242	139	133
29.1	176	206	174	174	211	211	244	244	198	198	230	230	139	133
30.1	176	206	176	176	213	211	244	226	198	198	248	230	139	133

C. Gráficas de las frecuencias de alelos obtenidos para la población "Maravillas"

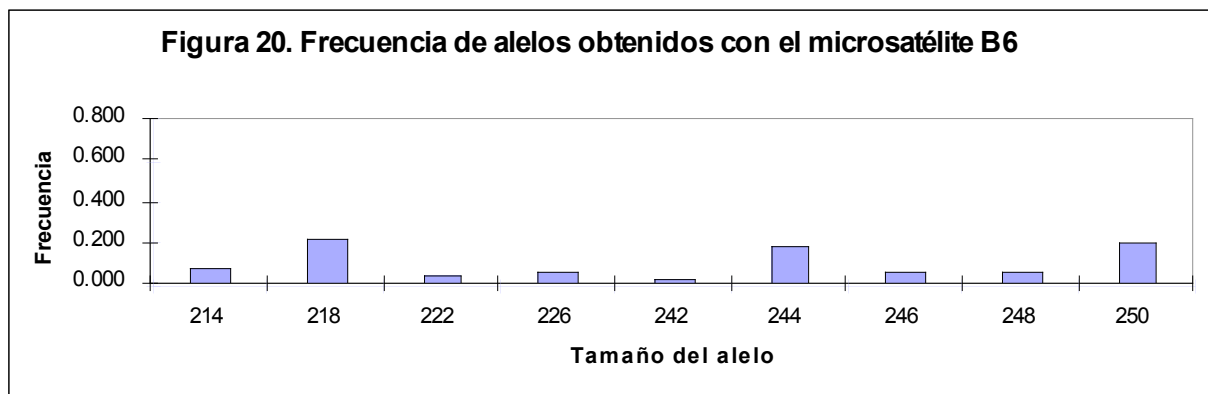
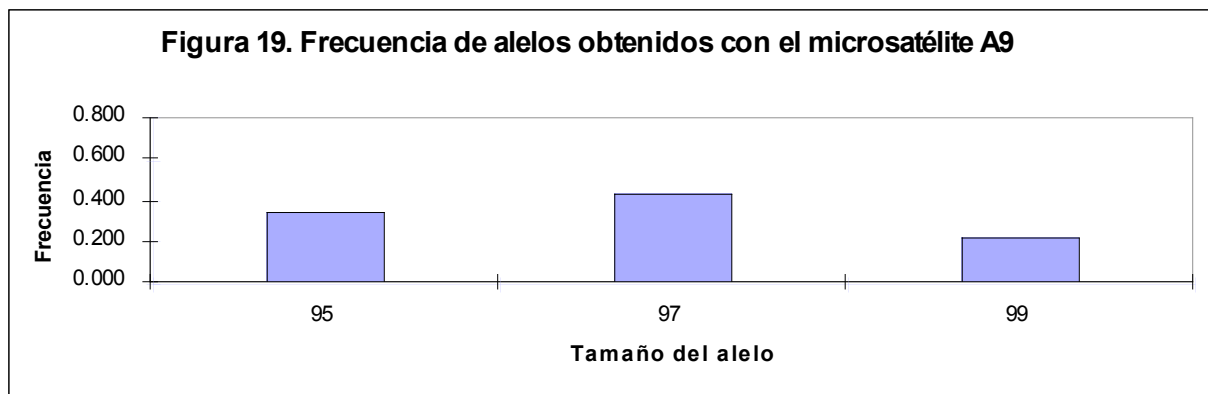
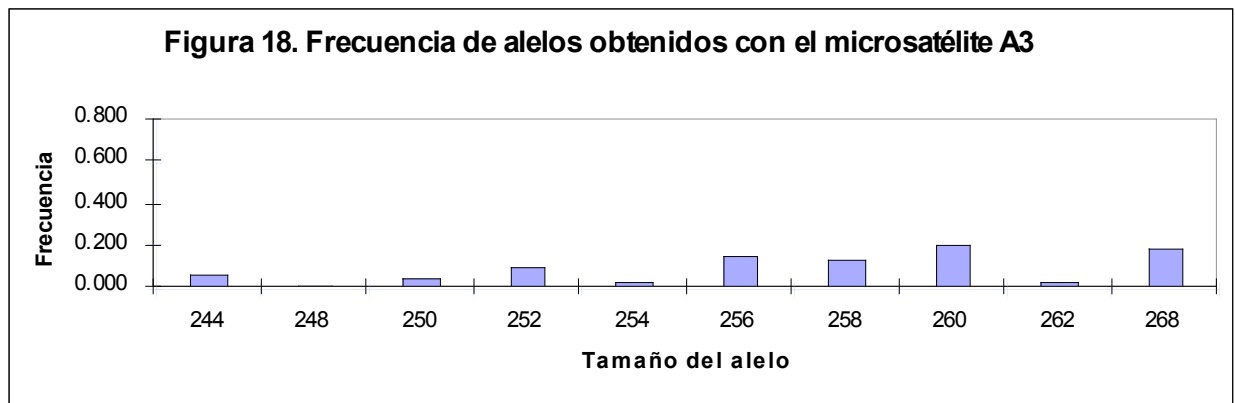


Figura 21. Frecuencia de alelos obtenidos con el microsatélite B12

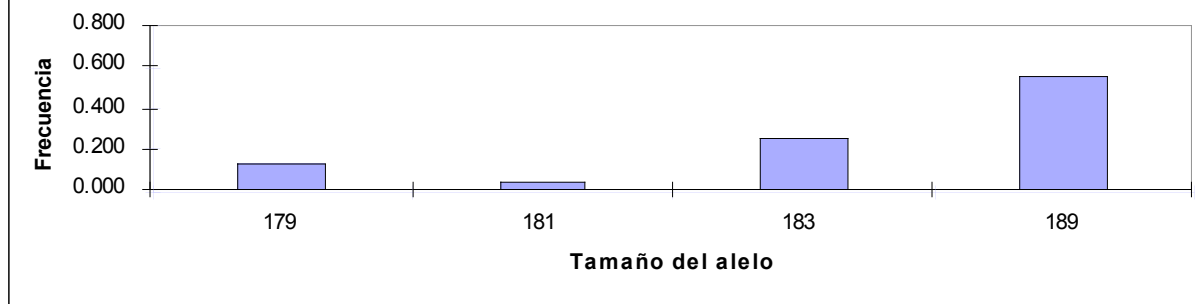


Figura 22. Frecuencia de alelos obtenidos con el microsatélite C3'

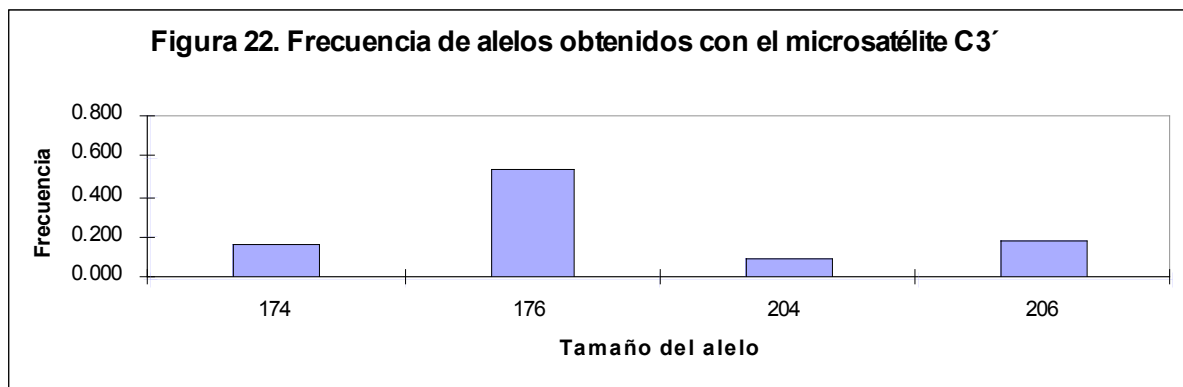
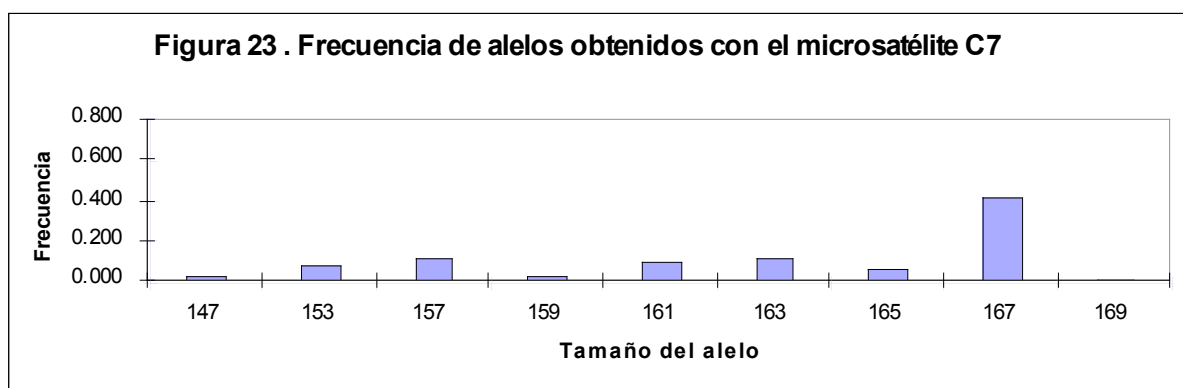
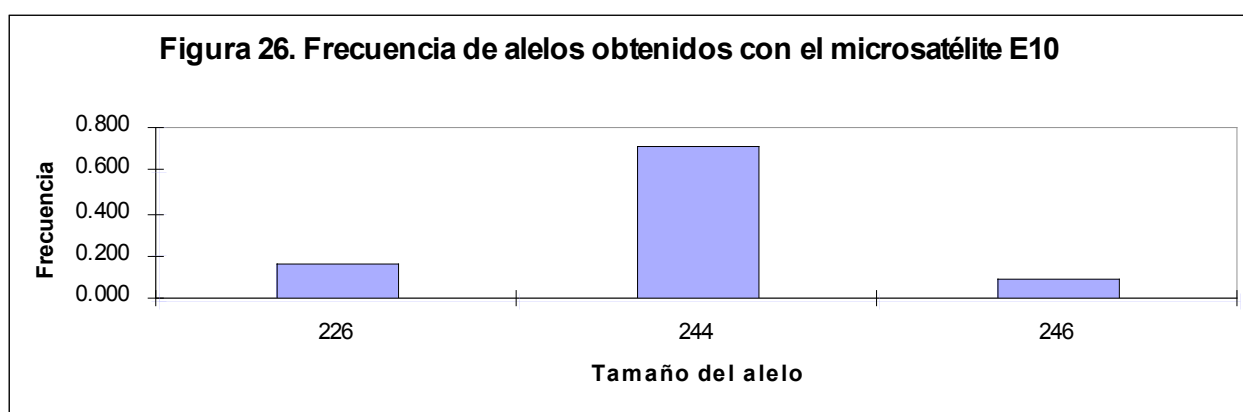
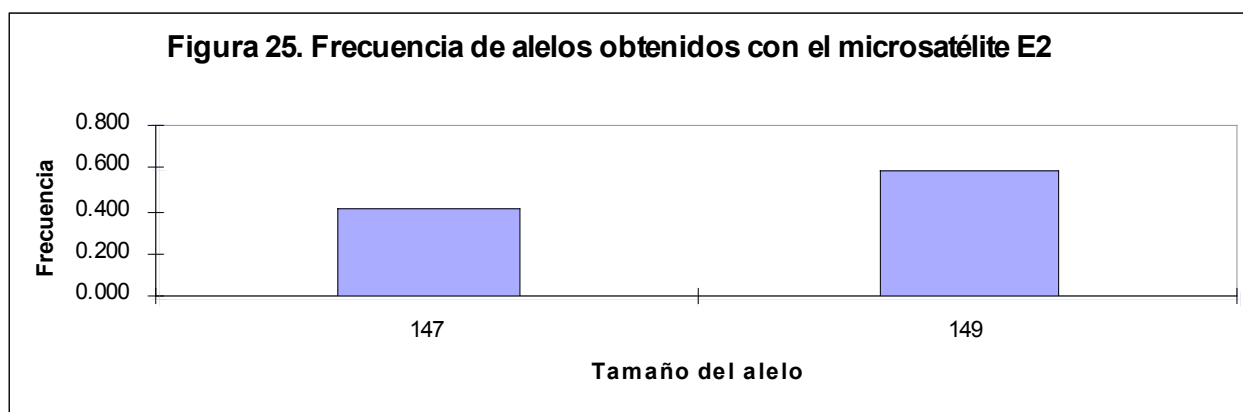
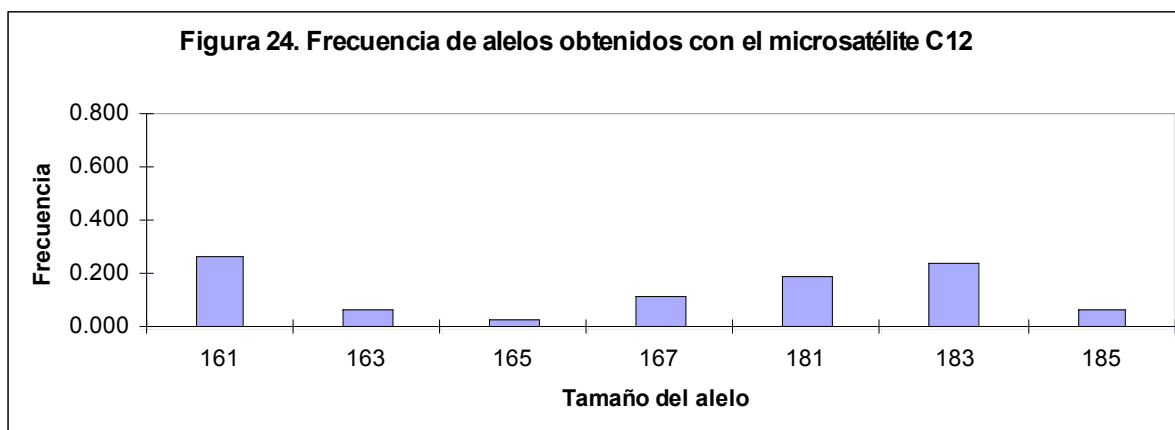
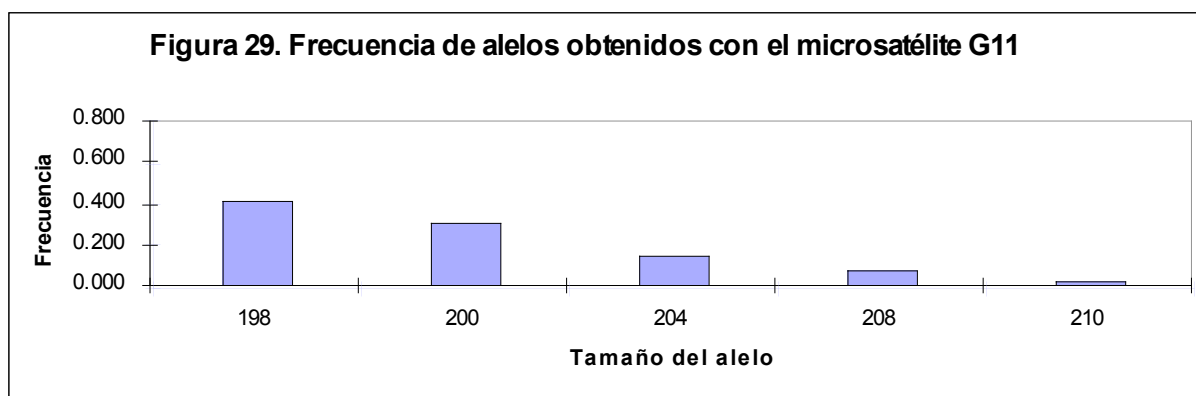
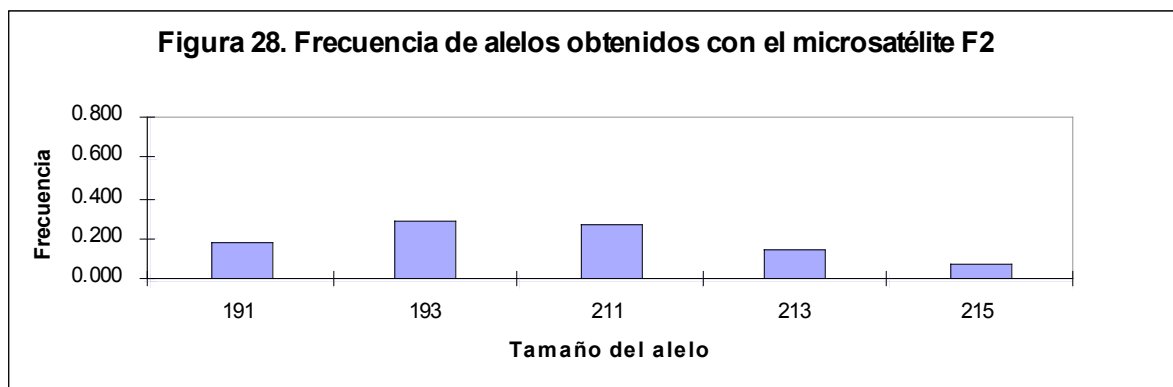
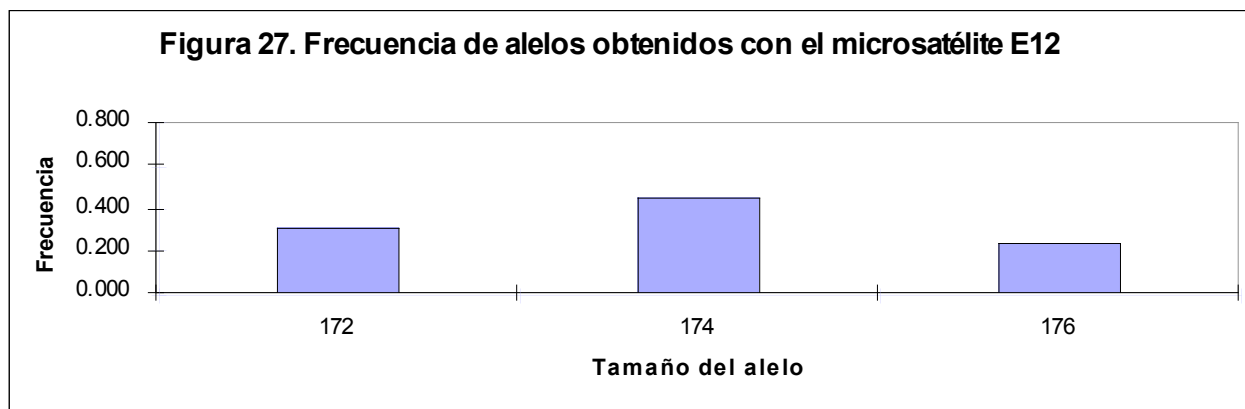
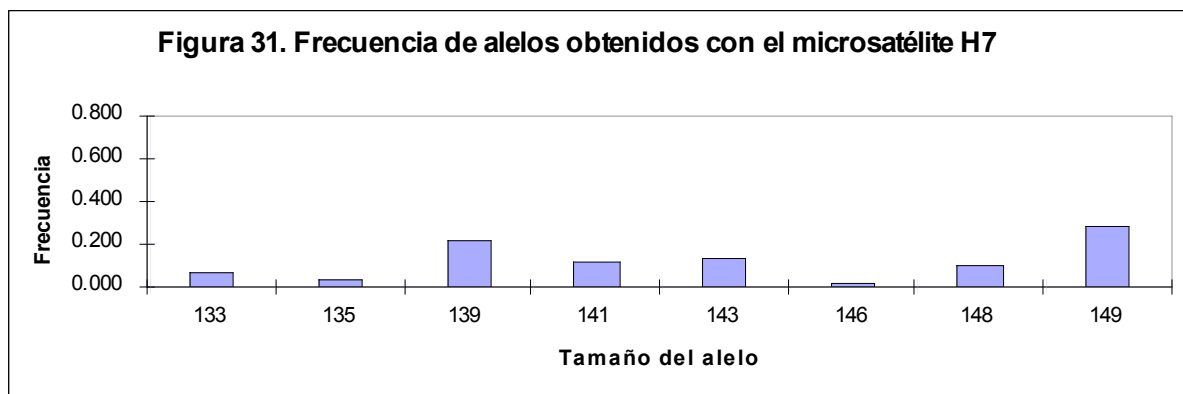
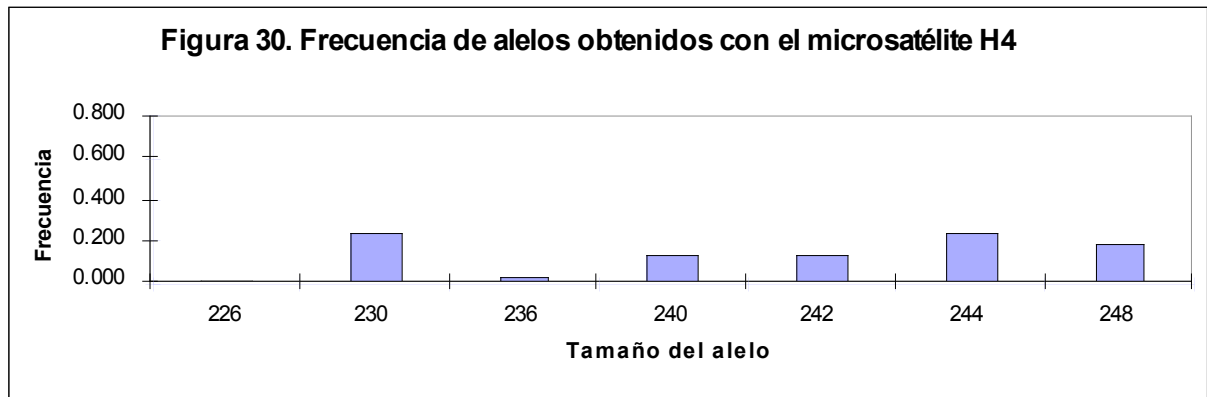


Figura 23 . Frecuencia de alelos obtenidos con el microsatélite C7









D. Glosario

Alogamia: Fecundación de la flor con el polen de otra flor. Se opone a autogamia.

Autogamia: Polinización de una flor por medio de su propio polen. Se opone a alogamia.

Ecotipo: Variante de una ecoespecie adaptada a un ambiente particular o un ecosistema definido.

Inflorescencia: Se llaman inflorescencias a las ramificaciones del tallo que portan las flores.

Polimorfismo: Locus genético que está presente en dos o más alelos distintos.

Polinización cruzada: transferencia del polen desde la antera hacia el estigma de una flor de otra planta.

Propagación vegetativa: método de propagación de plantas que comprende procedimientos sencillos como los acodos, estacas, injertos y esquejes, hasta tecnologías avanzadas como la micropropagación *in-vitro*.

Tipo: Ejemplar característico que posee los rasgos propios de una especie o género a los que representa.