

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades



**Identificación de siete especies de *Annona* (Annonaceae)
mediante los polimorfismos de la longitud de los
fragmentos de restricción (RFLP) utilizando ADN
cloroplastidial**

Trabajo de graduación presentado por
Arturo José Monterroso García para optar al grado académico de
Licenciado en Biología

Guatemala

2013

**Identificación de siete especies de *Annona* (Annonaceae)
mediante los polimorfismos de la longitud de los
fragmentos de restricción (RFLP) utilizando ADN
cloroplastidial**

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades

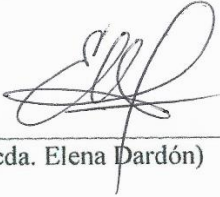
**Identificación de siete especies de *Annona* (Annonaceae)
mediante los polimorfismos de la longitud de los
fragmentos de restricción (RFLP) utilizando ADN
cloroplastidial**

Trabajo de graduación presentado por
Arturo José Monterroso García para optar al grado académico de
Licenciado en Biología

Guatemala

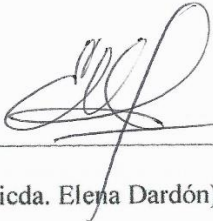
2013

Vo. Bo. :


(f) 

(Licda. Elena Dardón)

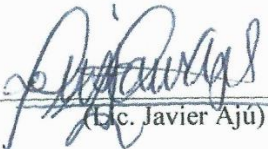
Tribunal Examinador:

(f) 

(Licda. Elena Dardón)

(f) 

(Licda. Margarita Palmieri)

(f) 

(Lic. Javier Ajú)

Fecha de aprobación: Guatemala, 26 de noviembre de 2013

CONTENIDO

	Página
LISTA DE CUADROS.....	vi
LISTA DE FIGURAS.....	vii
RESUMEN	viii
ABSTRACT.....	ix
Capítulos	
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. MÉTODOS.....	14
III. RESULTADOS.....	20
IV. DISCUSIÓN.....	27
V. CONCLUSIONES	32
VI. RECOMENDACIONES.....	33
VII. LITERATURA CITADA.....	34
VIII. APÉNDICES.....	38

LISTA DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Volúmenes de reactivos de cada digestión realizada con <i>Sau3AI</i> y <i>ApaI</i> (Promega)	17
2. Mapa de restricción con la enzima <i>Sau3AI</i>	20
3. Mapa de restricción con la enzima <i>ApaI</i>	21
4. Tamaños (en pares de bases) correspondientes a las bandas que se muestran en la Figura 5 ...	22
5. Tamaños promedio y desviación estándar de las bandas del perfil de cada especie	25
6. Tamaños correspondientes a las bandas esperadas de acuerdo al análisis de geles virtuales	25
7. Tamaños de las bandas de las siete muestras desconocidas	25

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Representación gráfica de un marcador de ADN	7
2. Región <i>trnL-trnF</i> del genoma cloroplastidial	8
3. Sitios de restricción de <i>ApaI</i> y <i>Sau3AI</i> en una secuencia de <i>Annona cherimola</i>	9
4. Diagrama de flujo para procesar geles de agarosa en TotalLab Quant versión 1.0.9.0.....	19
5. Productos de PCR digeridos con <i>Sau3AI</i> y <i>ApaI</i> en un gel de agarosa al 3.0%.....	22
6. Perfiles de RFLP para: <i>A. macrophyllata</i> , <i>A. purpurea</i> , <i>A. reticulata</i> , <i>A. squamosa</i>	23
7. Perfiles de RFLP para: <i>A. muricata</i> , <i>A. glabra</i> , <i>A. cherimola</i>	24
8. Comparación de migración de bandas de la misma escalera molecular.....	26

RESUMEN

Se estableció un método para poder distinguir entre siete especies de anonas guatemaltecas. Utilizando secuencias de ADN de cloroplasto y software bioinformático se eligió un marcador y dos enzimas de restricción: la región de ADN cloroplastidial *trnL-trnF* y las enzimas de restricción *Sau3AI* y *ApaI*, respectivamente. La región *trnL-trnF* fue la única suficientemente polimórfica para este análisis debido a que tiene sitios de corte distintos con las enzimas seleccionadas. Veintisiete productos de amplificación fueron analizados con dichas enzimas y con la información obtenida se generaron perfiles de RFLP para cada especie. Cinco especies tienen perfiles únicos y otras dos especies comparten un mismo perfil distinto a los otros cinco. Es posible distinguir estas cinco especies entre sí (*A. cherimola*, *A. glabra*, *A. macrophyllata*, *A. muricata* y *A. purpurea*) y entre éstas y las dos especies restantes (*A. reticulata* y *A. squamosa*). Los perfiles de RFLP son consistentes y reproducibles. Los patrones obtenidos (número y tamaño aproximado de las bandas) son consistentes al ser fácilmente reconocibles en diferentes digestiones y geles de agarosa. Los patrones se mantienen de una digestión y electroforesis a otra, por lo que son reproducibles. Utilizando este método se lograron identificar exitosamente siete productos de PCR cuya especie era desconocida.

ABSTRACT

A simple method to discriminate between seven Guatemalan *Annona* species was developed. DNA sequences and bioinformatic software were used to identify a suitable cDNA marker and restriction enzymes. The *trnL-trnF* chloroplast region and the *Sau3AI* and *ApaI* enzymes were selected. This cDNA region was the only one that exhibited sufficient polymorphism for suitable use with the aforementioned enzymes. Twenty seven PCR products were digested and RFLP profiles were generated for each species. Five species have unique profiles, while two others share the same one. It is possible to discriminate between *A. cherimola*, *A. glabra*, *A. macrophyllata*, *A. muricata* and *A. purpurea* (five different profiles) and between these five species and *A. reticulata* and *A. squamosa* (identical profile for both). The profiles are consistent and reproducible. The band patterns hold and are easily recognized among different digestions and agarose gels. Seven PCR products whose species were unknown were positively identified using this method.

I. INTRODUCCIÓN

Realizar investigación en Guatemala es difícil debido a la falta de conocimiento general que se tiene acerca de qué es una investigación científica y de su constante necesidad para el progreso de la ciencia. Las disciplinas científicas y las ciencias puras han sido relegadas a un segundo plano con respecto a las disciplinas más prácticas y utilitarias, más populares con el público en general. Para que estas disciplinas puedan seguir innovando y aprovechando los recursos que están a nuestro alcance, es necesario que se den avances en el conocimiento científico y esto sólo es producto de la investigación. Realizar investigación en nuestro país beneficia a todos, no sólo a los científicos. Por eso es importante desarrollar proyectos y llevarlos a cabo, no importando su complejidad o envergadura. Un paso más allá de esto son proyectos que se desarrollan sobre las bases de un proyecto anterior o uno más grande, como es el caso de este trabajo de investigación. Trabajar en conjunto con otros científicos y compartir la información es el fundamento sobre el que se puede generar más y mejor conocimiento.

Poder combinar e integrar información es importante. En el campo de la biología, conocer tanto las características físicas de los organismos como poder estudiarlos a nivel genético y molecular es imprescindible. Debemos ser científicos completos, aunque bien es cierto que no podemos ser expertos en todas las áreas y por eso debemos apoyarnos en nuestros colegas. Este trabajo es un ejemplo de esta combinación de talentos e información. Aprovechando la información botánica, genética y molecular generada por el estudio de Ajú (2012) y utilizando técnicas sencillas de análisis de secuencias y fragmentos de ADN y potentes programas de ordenador bioinformáticos, se generó información totalmente nueva y útil para cualquier estudio a realizarse con anonas en el país. Este es un trabajo importante y podrá ser utilizado como referencia a futuro para cualquier otra persona que quiera entender, utilizar e incluso mejorar los métodos aquí empleados.

A. Antecedentes

1. Taxonomía y morfología. Annonaceae es una familia de árboles de zonas bajas que crecen principalmente en el sotobosque. Se caracteriza porque la corteza externa se desprende en tiras y la corteza interna es reticulada; las hojas son simples, dísticas, enteras y generalmente aromáticas; las flores son solitarias o reunidas en cimas helicoides con todas las ramas en un mismo plano, llamadas ripidios; el perianto es trímero y generalmente con dos verticilos de pétalos. Los estambres son numerosos, los carpelos libres y los frutos generalmente apocárpicos. La familia tiene distribución pantropical y se encuentra principalmente en alturas menores de 2000 m; comprende unas 2000 especies y 130 géneros (Cruz y Deras 2000, Maas *et al.* 1994).

a. *Annona cherimola* Mill. Es un arbusto o árbol pequeño, comúnmente de 5 a 9 metros. Las hojas son membranosas y comúnmente elípticas; de 8-15 cm de largo y 4-9 cm de ancho y con peciolo de 8-12 mm de largo. En el ápice las hojas son redondeadas a obtusas y raramente son acutas; son cuneadas a redondeadas en la base, seríceas en el haz y al crecer se vuelven glabras; en el envés son velutinosas-tomentosas. Las flores son opuestas a las hojas, se encuentran solitarias o binadas y tienen pedicelos tomentosos de 8-12 mm de largo. Los sépalos son triangulares, tomentosos y de 2-4 mm de largo. Los pétalos miden de 1.5 a 2-5 cm de largo, son lineares y obtusos; por dentro son verduzcos y por fuera son ferruginosos-tomentosos. El fruto es globoso u ovoide y generalmente es suave; la superficie posee protuberancias redondeadas y está marcada con areolas en forma de u. La pulpa del fruto es blanca y las semillas son negras (Stanley y Steyermark 1946).

b. *Annona glabra* L. Es un arbusto o árbol pequeño, generalmente de 10 m de alto. Las hojas tienen peciolo cortos, son papiráceas y de color verde brillante; son ovadas-elípticas a oblongadas-elípticas de 7-14 cm de largo y 3-8 cm de ancho. Las hojas son glabras, tienen el ápice acuto corto y a veces obtuso: son redondeadas u obtusas en la base. Las flores son solitarias y cuelgan de los peciolo; los pedicelo son glabros y miden 1.5-2 cm de largo. Los sépalos son redondeados, apiculados y glabros; miden 3-5 mm de largo. Los pétalos son glabros por fuera, los externos son ovados y miden 2.5-3 cm de largo. Los pétalos internos son más pequeños. Los frutos son globosos-ovoides, de 5-12 cm de largo, suaves, amarillentos en la madurez y la pulpa es de color crema (Stanley y Steyermark 1946).

c. *Annona macropphyllata* Donn. Smith. Es un árbol pequeño, con hojas membranosas, glabras, obovadas de 8-14 cm de largo y 4-6 cm de ancho; los peciolo miden 8-18 mm. El ápice de la hoja es redondeado o subacuto y la base es acuta o redondeada; el envés es glauco. También posee otro tipo de hojas en forma de bráctea de 2-4 cm de largo; aparecen en las bases de las ramas con inflorescencias. Las flores son solitarias, los pedicelo son delgados, glabros, recurvados o pendulosos de 3-5 cm de largo. Los sépalos son redondeados-trianguulares y miden 2-3 mm de largo. Los pétalos externos son lineares-oblongos, obtusos y escasamente pubescentes hacia afuera; miden 2-5 cm de largo. Los pétalos internos son rudimentarios. El fruto es ancho y ovoide, tomentoso, generalmente de 13-15 cm de largo y 12-15 cm de ancho; se encuentra cubierto con protuberancias bajas y redondeadas. La pulpa es de color crema o coloreada de un rosa pálido (Stanley y Steyermark 1946, Hernández y León 1992).

d. *Annona muricata* L. La guanaba es un árbol pequeño, de 8 metros de alto. Las hojas están en peciolo de 5 mm de largo; son papiráceas, lustrosas, obovadas a oblongas, de 8-15 cm de largo y 3-6 cm de ancho. El ápice es obtuso corto y acuto, la base es corta y acuta. Las hojas son glabras en el haz y seríceas en el envés, al madurar se vuelven glabras. Las flores son solitarias, terminales u

opuestas a las hojas, los pedicelos son seríceos y miden 1.5-2 cm de largo. Los pétalos externos son redondeados-ovados, acutos contraídos en el ápice y cordados en la base; miden 2.5-3.5 cm de largo, son amarillentos. Los pétalos internos son más pequeños. El fruto es ovoide u oblongo-ovoide, verde, cubierto con tubérculos curvos flexibles en forma de espinas; mide 15-20 cm de largo. Las semillas son negras, de 1.5 cm de largo (Stanley y Steyermark 1946).

e. *Annona purpurea* Mociño y Sessé ex Dunal. Es un árbol de 10 metros de alto. Las hojas son grandes, deciduas, membranosas y se encuentran en peciolos de 3-5 mm de largo. Las hojas son anchamente obovadas a elíptico-obovadas, principalmente de 12-30 cm de largo y 6-14 cm de ancho. El ápice es corto acuminado y redondeado en la base. Las hojas son verdes y glabras en el haz, en el envés son pálidas. Las flores son extra-axilares, solitarias y subsésiles. Los sépalos son triangulares-ovados, acuminados, de 1-2 cm de largo. Los pétalos externos son valvados, gruesos y rígidos, ovados-lanceolados, de hasta 5 cm de largo y 2 cm de ancho. Los pétalos internos son imbricados, más delgados, elíptico-oblongados y redondeados en el ápice; miden 2.5 cm de largo y 1.5 cm de ancho. El fruto es subgloboso, de 10-12 cm de diámetro o mayor; está cubierto con un tomentum áspero, con numerosas y duras proyecciones piramidales; es anaranjado y con poco sabor. Las semillas son obovoides, castañas y de 3 cm de largo (Stanley y Steyermark 1946).

f. *Annona reticulata* L. La anona colorada es un árbol pequeño, de hasta 12 metros de alto. Las hojas se encuentran en peciolos de 8-12 mm de largo; son membranosas, lanceoladas a oblongo-lanceoladas, principalmente de 10-20 cm de largo y 2-5 cm de ancho. El ápice es largo acuminado y la base es acuta a redondeada. Las hojas se oscurecen al secarse y al brotar son piloso-aplanadas en ambos lados, pero luego se vuelven glabras y ligeramente pálidas en el envés. Las inflorescencias emergen desde el medio de los entrenudos, raramente son opuestas a las hojas y contienen varias flores; los pedicelos son seríceos-grisáceos de 1.5-2.5 cm de largo. Los sépalos son redondeados-triangulares, acuminados y de 2-3 mm

de largo. Los pétalos son lineares-oblongos, obtusos, con cierta dilatación en la base, puberulentos en el exterior y de 1.5-2.5 cm de largo. El fruto es globoso-ovoide, de 8-12 cm de diámetro y algunas veces mayor; usualmente es rojizo oscuro o café rojizo; es suave, con areolas apenas visibles y con pulpa dulce (Stanley y Steyermark 1946).

g. *Annona squamosa* L. Es un arbusto o árbol pequeño, usualmente de 3-6 metros de alto. Las hojas se encuentran en peciolos de 6-12 mm de largo; son membranosas, elípticas o lanceoelípticas, de 5-11 cm de largo y 2-5 cm de ancho. Las hojas en el ápice son subacutas y cuneadas en la base; usualmente se oscurecen al secarse; son grisáceas y seríceas de jóvenes pero glabras al madurar; usualmente son glaucas en el envés. Las flores se encuentran opuestas a las hojas, son amarillas y se encuentran solitarias o en inflorescencias con pocas flores. Los pedicelos son glabros o pubescentes, de 1-2 cm de largo. Los sépalos son lineares-oblongos, obtusos, glabros o tomentosos por fuera y de 1.5-3 cm de largo. Los pétalos internos son rudimentarios. El fruto es globoso o cordado-ovoide, glabro, glauco y de 8-9 cm de diámetro. Los carpelos no están completamente fusionados y se proyectan como protuberancias redondeadas. La pulpa es blanca amarillenta, cremosa, muy dulce y de buen sabor (Stanley y Steyermark 1946).

2. Aprovechamiento y conservación. Las áreas con mayor diversidad genética del país no están incluidas dentro del Sistema Guatemalteco de Áreas Protegidas (SIGAP). Entre estas zonas importantes está la región central de Huehuetenango y los municipios de Nentón, Jacaltenango, Santa Ana, San Antonio y Concepción Huista, y los departamentos de Jalapa y Chiquimula (Ajú 2012).

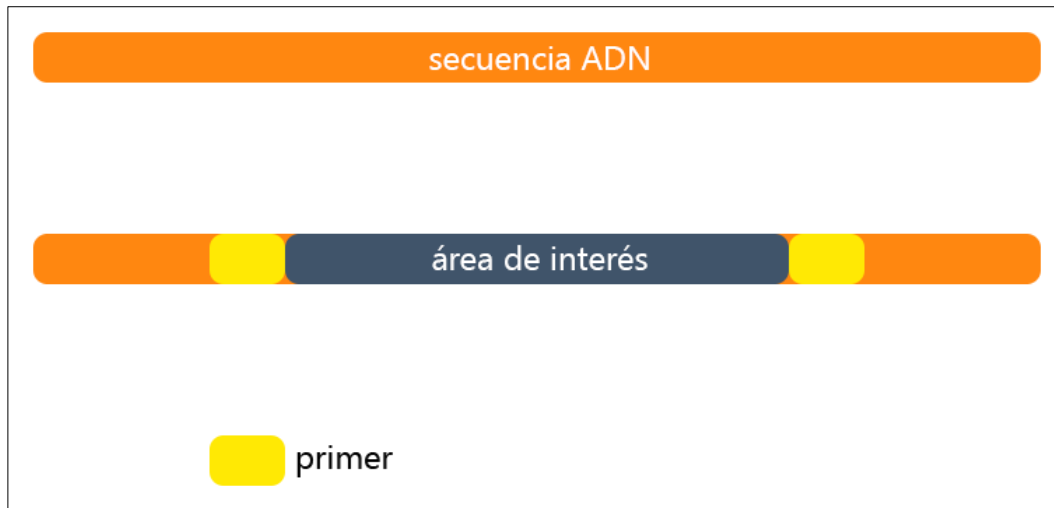
Una primera aproximación a la conservación de las anonas podría consistir en la implementación de la estrategia de “conservación por medio de la utilización”, una estrategia planteada para la conservación de bosques, y en específico de árboles maderables, pero que podría resultar útil para árboles frutales como las anonas. El éxito de esta estrategia se ha debatido y aún no se ha demostrado que sea efectiva,

pero mucho depende de qué tanto se tomen en cuenta aspectos ecológicos, económicos y sociales al momento de implementarla (Newton 2008, Oldfield 2008).

Los programas de conservación *in situ* son preferibles para la conservación de especies importantes. En el caso de las anonas, cuyas poblaciones están localizadas principalmente en huertos familiares, el potencial para fomentar y mejorar estos huertos y crear un programa de conservación *in situ* es grande. El éxito de este programa dependería del impulso de un mercado para el consumo de los frutos con valor alimenticio y de que los productores obtuvieran beneficios tangibles, logrando así una mejora en calidad de vida (Prado 2005, Oldfield 2008).

3. Marcadores de ADN. Un marcador de ADN es una región del genoma de un organismo que contiene información útil. Existen distintos tipos de marcadores, cada uno con características que los definen y hacen más adecuados para uno u otro tipo de pruebas (Jarne y Lagoda 1996, Selkoe y Toonen 2006). Un buen marcador de ADN debe estar bien distribuido en el genoma y tener un alto grado de polimorfismo (Jarne y Lagoda 1996, Aranguren-Méndez *et al.* 2005, Selkoe y Toonen 2006). Las regiones que flanquean al marcador generalmente están bien conservadas (Jarne y Lagoda 1996, Selkoe y Toonen 2006) y sirven para desarrollar oligonucleótidos complementarios. Estos oligonucleótidos se conocen comúnmente como “primers”, “cebadores” o “iniciadores” y hoy en día se puede utilizar un único primer o una combinación de varios primers para aislar y amplificar diferentes marcadores mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Selkoe y Toonen 2006). Los marcadores de ADN se utilizan para una variedad de propósitos como mejoramiento de cultivos, evaluación de la diversidad biológica, reconstrucción precisa de relaciones filogenéticas y entender la estructura, evolución e interacción de poblaciones (FAO/IAEA 2002). Una representación gráfica sencilla de un marcador de ADN se muestra en la Figura 1.

Figura 1. Representación gráfica de un marcador de ADN.

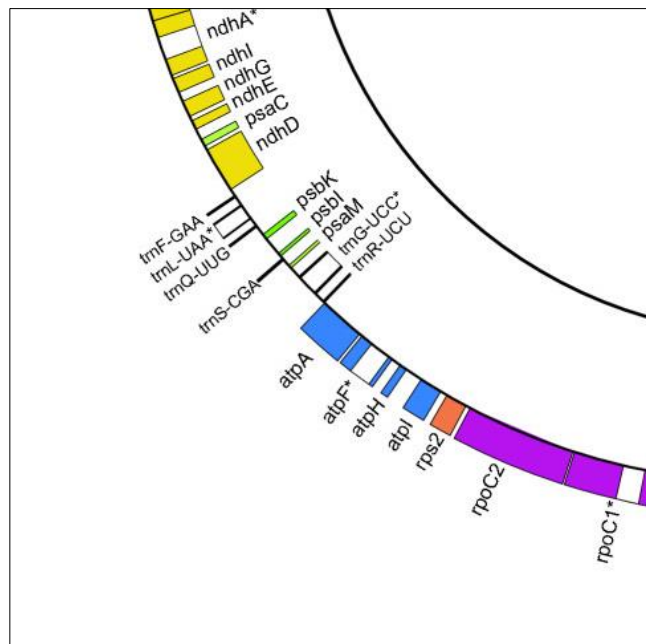


4. Marcadores de ADN de cloroplasto. Los marcadores de ADN de cloroplasto son regiones del genoma de este organelo que proveen información útil acerca del organismo que los posee. Hace más de veinte años que se desarrolló un conjunto de primers universales para amplificar intrones (regiones no-codificantes) y regiones intergénicas en una amplia variedad de especies. Es en estas regiones donde ocurre la mayor tasa de mutaciones y, por lo tanto, incrementa la probabilidad de encontrar polimorfismos inter e intraespecíficos. Entre estas regiones importantes se encuentran el intrón *trnL* y la región intergénica *trnL-trnF* (Figura 2). El intrón *trnL* no es el más variable, pero posee otras ventajas. Desde que se diseñaron, sus primers han sido utilizados ampliamente y su evolución se conoce muy bien porque ha sido analizada a profundidad o largo de los años. Incluso, este intrón se ha sugerido como buen candidato para realizar identificación de especies mediante códigos de barras (Taberlet *et al.* 1991, Provan *et al.* 2001, Taberlet *et al.* 2007).

En contraste, la región *trnL-trnF* parece tener una mayor tasa de mutaciones y la han identificado como una de las regiones importantes para la búsqueda de microsatélites de cloroplasto, marcadores altamente polimórficos. Utilizando ambas regiones en conjunto y analizando los fragmentos de productos de amplificación mediante la digestión con endonucleasas (enzimas de restricción), es

posible incrementar la resolución del ADNcp para detectar polimorfismos incluso a nivel intraespecífico (Taberlet *et al.* 1991, Provan *et al.* 2001, Taberlet *et al.* 2007).

Figura 2. Localización de la región intergénica *trnL-trnF* en el genoma cloroplastial de *Cryptomeria japonica* D. Don.



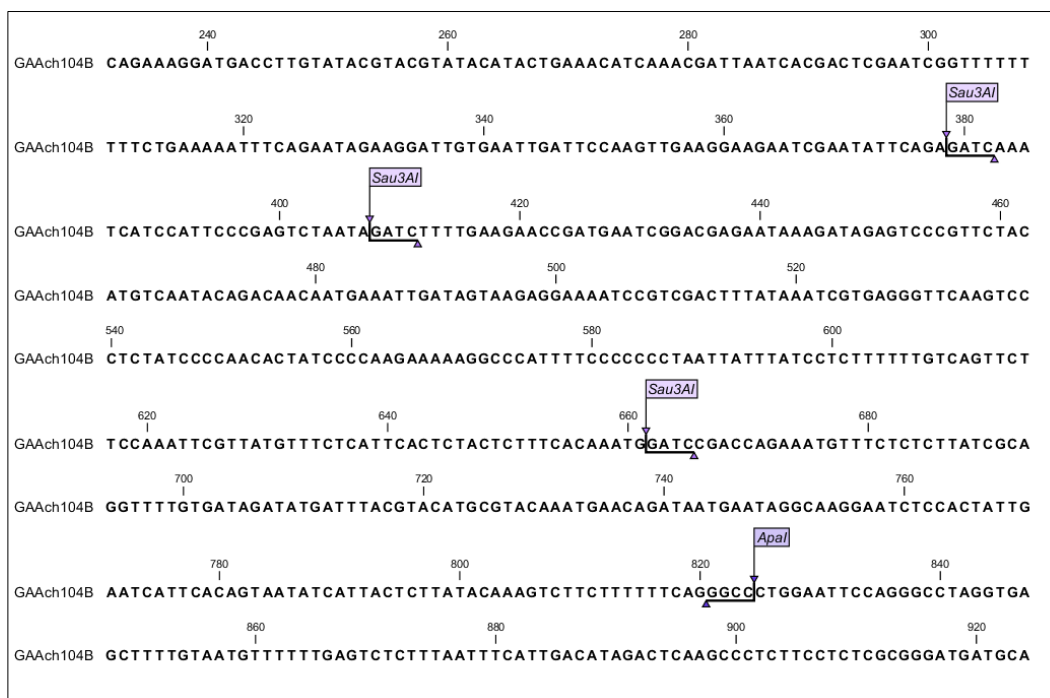
(Imagen original disponible en: <http://j.mp/1olGB8Y>)

5. Enzimas de restricción y RFLP. Las enzimas de restricción, también llamadas endonucleasas de restricción, son proteínas que reconocen una secuencia específica en un fragmento de ADN y cortan dicho fragmento en ese lugar, conocido como sitio de restricción. Estos sitios de restricción pueden encontrarse en diferentes posiciones en distintas especies, debido a la variación interespecífica, haciendo a estas enzimas una herramienta útil para la discriminación entre especies, e incluso en algunos casos son útiles a nivel intraespecífico, cuando la variación entre las secuencias de la misma especie es suficientemente alta (Parani *et al.* 2001, Paxinos *et al.* 1997, Russell *et al.* 2000).

RFLP es una técnica que involucra la amplificación de algún marcador de ADN, en este caso cloroplastial, y la digestión de ese fragmento amplificado con una o

varias enzimas de restricción. Idealmente se obtienen fragmentos de restricción de distintos tamaños dependiendo de la especie del organismo del que el ADN fue extraído y amplificado. Es decir, distintas especies cuyo ADN se amplifique con un mismo marcador y se digiera con las mismas enzimas de restricción, van a generar fragmentos de restricción de distinto tamaño. Estos fragmentos pueden luego observarse en geles convencionales de agarosa y el resultado será un patrón de bandas distinto para cada especie. La técnica se basa y depende del polimorfismo de los fragmentos de restricción, es decir, que estos fragmentos sean de distintos tamaños. Si estos fragmentos son de tamaños iguales, no se puede distinguir entre una especie y otra, y es aquí donde escoger un marcador molecular y una o una combinación de enzimas de restricción adecuada es importante (Parani *et al.* 2001, Paxinos *et al.* 1997, Russell *et al.* 2000). En la Figura 3 se muestran los sitios de restricción de las enzimas *ApaI* y *Sau3AI* en una secuencia de *Annona cherimola*.

Figura 3. Sitios de restricción de *ApaI* y *Sau3AI* en una secuencia de *Annona cherimola*.



B. Justificación

Regularmente, en países como el nuestro, no se realizan proyectos de investigación sobre ningún tipo de organismo. Esto ha limitado en gran medida el conocimiento que tenemos acerca de muchas especies vegetales y animales de las regiones tropicales. No conocemos su diversidad genética ni en qué etapas de domesticación se encuentran, o si poseen alguna del todo. Muchas de las especies vegetales potencialmente interesantes se encuentran dispersas en poblaciones silvestres o en huertos familiares (Ajú 2012, Martínez 1995, van Zonneveld *et al.* 2012). Este es el caso puntual de las anonas, evidenciado por el trabajo de investigación realizado por Ajú (2012).

Las especies locales de anonas podrían tener características deseables para fomentar su domesticación, pero es necesario realizar investigaciones de diversa índole para saber cuáles son estas características y cómo podemos aprovecharlas (van Zonneveld *et al.* 2012). Las anonas son un buen candidato porque varias especies son comestibles y tienen un alto nivel nutricional y, por lo tanto, son potencialmente importantes para la seguridad alimentaria del país (Martínez 1995, Murillo-A 2001, Chízmar *et al.* 2009). Es importante saber identificar las especies locales para conocerlas, entender cómo aprovechar las características de cada una y conocer su diversidad genética. No podemos aprovechar ni conservar algo que no conocemos y que no sabemos que tiene características importantes.

Las especies vegetales se pueden identificar mediante sus características físicas, es decir, su morfología. ¿Por qué no utilizar este método para identificar nuestras anonas? La identificación basada en la morfología puede llegar a ser imprecisa y, en general, dependemos de que la persona que realice la identificación sepa lo que hace y que tenga un buen conocimiento de la familia o género al que pertenecen las especies de nuestro interés. También es importante mencionar que para realizar una identificación precisa de alguna especie vegetal es necesario que nuestro ejemplar tenga presentes hojas, flores y frutos. De lo contrario el proceso se vuelve mucho

más complejo y es necesaria una identificación basada en morfología foliar (características físicas de las hojas). En el caso de las anonas, identificarlas en base a su morfología es complicado pues estos árboles permanecen defoliados durante buena parte del año y sus flores y frutos se producen durante intervalos muy cortos (Ajú 2012).

Ajú (2012) produjo secuencias de ADN de cada una de las siete especies de anona con las que trabajó. ¿Por qué no utilizar esta información para identificar individuos? Principalmente porque el proceso es largo y costoso. Se debe extraer el ADN de cada individuo, amplificarlo utilizando la técnica de PCR con un marcador de ADN adecuado, purificar ese producto de amplificación y enviarlo a secuenciar fuera del país para obtener su secuencia y así poder compararla con las secuencias que ya tenemos. Este es un método preciso, pero no es conveniente; por lo tanto es necesario desarrollar un método alternativo. Este método alternativo debe incrementar la confiabilidad y precisión de la identificación de cada especie (en comparación con la identificación basada en la morfología), ser más rápido, más barato y se debe poder realizar totalmente en Guatemala.

El método aquí propuesto se basa en la utilización de productos de PCR, enzimas de restricción y la técnica de RFLP. Muchas investigaciones han demostrado que la utilización de los marcadores de ADN adecuados en combinación con las enzimas de restricción correctas permite distinguir entre especies, ya sean éstas vegetales o animales (Parani *et al.* 2001, Paxinos *et al.* 1997, Russell *et al.* 2000). Ha sido posible distinguir diez especies de salmón, tres especies de cánidos, siete especies de cereales y 44 especies de micobacterias, entre otros, a partir de distintos tipos de tejido, generando perfiles especie-específicos (Lee *et al.* 2000, Parani *et al.* 2001, Paxinos *et al.* 1997, Russell *et al.* 2000). Estos perfiles permiten establecer bibliotecas de “huellas dactilares” o perfiles de referencia para uso a futuro. Este método es una alternativa simple y económica a la secuenciación, la eficiencia y especificidad de los resultados obtenidos es

excelente, es un proceso más rápido y permite reducir costos al eliminar gastos como el envío y recepción de muestras.

Para seleccionar el marcador de ADN de cloroplasto y las enzimas de restricción adecuados se utilizaron tres programas bioinformáticos. Dos de estos programas (CLC Main Workbench y NEBcutter) se utilizaron para generar información previa (*in silico*). Esta información generada virtualmente permitió identificar la combinación de marcador y enzimas óptimas para el desarrollo de este método sin tener que incurrir en gastos de adquisición de enzimas ni gastar insumos de laboratorio. Se generaron también resultados virtuales que sirvieron como parámetro de comparación para saber si el método estaba funcionando adecuadamente y cómo se esperaba a la hora de procesar muestras reales (*in vivo*). De no haber utilizado estas herramientas, el proceso de selección del marcador y de las enzimas habría sido uno de prueba y error, largo, y se habría incurrido en gastos adicionales y consumido recursos de más.

Los perfiles de RFLP que se produjeron durante el desarrollo de este método servirán como información de referencia para cualquier estudio posterior que se realice con las especies aquí estudiadas. El tercer programa bioinformático, TotalLab, permitió generar esta información con el nivel de precisión requerido y de una forma sencilla y rápida. De no contar con esta herramienta, generar esta información habría tomado más tiempo y la posibilidad de cometer algún error habría sido mayor.

El haber utilizado estas herramientas bioinformáticas permitió generar información útil y confiable que podrá ser utilizada para futuros trabajos de investigación. La documentación de los métodos utilizados garantizan que el método podrá ser replicado e incluso mejorado por cualquier individuo o institución que desee hacerlo.

C. Objetivos

1. Generales

Generar perfiles de RFLP para distinguir fácilmente entre *Annona cherimola*, *A. glabra*, *A. macrophyllata*, *A. muricata*, *A. purpurea*, *A. reticulata* y *A. squamosa*.

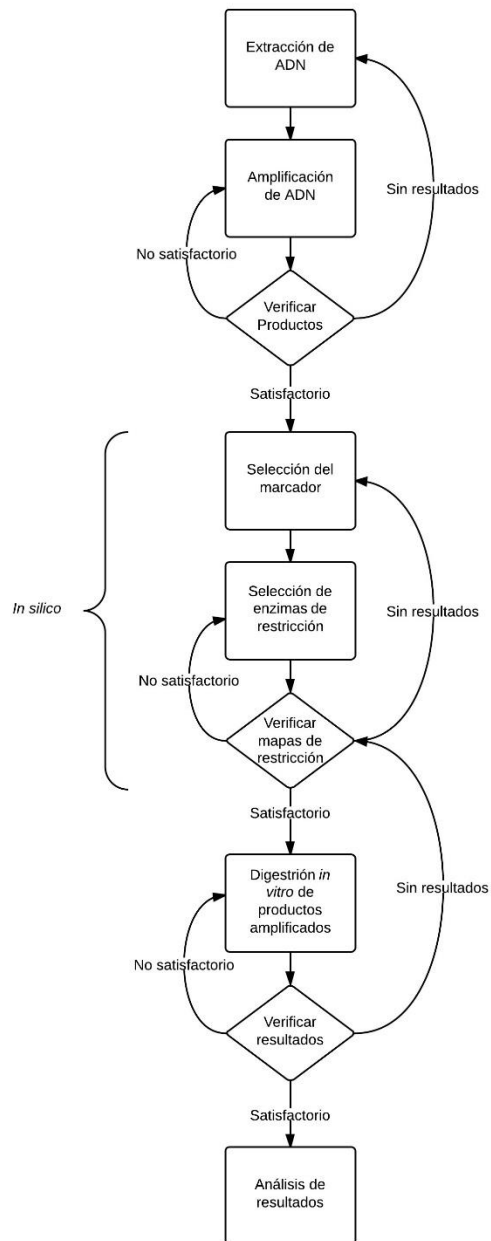
2. Específicos

- Identificar un marcador de ADN de cloroplasto que sea suficientemente variable para poder utilizar enzimas de restricción en los productos amplificados con dicho marcador.
- Identificar la o las enzimas de restricción que, en combinación con un marcador de ADN de cloroplasto específico, permitirá distinguir entre *Annona cherimola*, *A. glabra*, *A. macrophyllata*, *A. muricata*, *A. purpurea*, *A. reticulata* y *A. squamosa*.
- Establecer una biblioteca de “huellas dactilares” (perfiles) de referencia para *Annona cherimola*, *A. glabra*, *A. macrophyllata*, *A. muricata*, *A. purpurea*, *A. reticulata* y *A. squamosa*.
- Documentar la precisión y reproducibilidad de resultados obtenidos con las enzimas de restricción seleccionadas.

II. MÉTODOS

A. Procedimientos

1. Diagrama de flujo



2. Generalidades. Se utilizaron veintisiete productos de PCR purificados correspondientes a veintiséis muestras que incluyen siete especies de *Annona*. Estos productos fueron amplificados con los primers *trnL-trnFf* y *trnL-trnFr* y la región intergénica amplificada es la *trnL-trnF*. Este par de primers están identificados con la letra B en el trabajo de investigación de Ajú (2012).

3. Extracción de ADN. La serie de pasos que deben seguirse para extraer ADN de cada una de las muestras de material vegetal, los reactivos químicos y las recetas para preparar las soluciones necesarias para este proceso están documentadas detalladamente en el trabajo de investigación de Ajú (2012), específicamente los apéndices A, inciso 1, y B, incisos 1-3.

4. Amplificación de ADN. Este protocolo ha funcionado para amplificar ADN de cloroplasto de varias especies de anonáceas, específicamente la región *trnL-F*. Cada reacción de PCR tiene un volumen de 25 μ l, que contiene 60 ng de ADN, 0.65 μ M de cada primer, 0.125 mM de cada dNTP, 1 U de GoTaq polimerasa y buffer 1x (GoTaq Buffer 5x). El programa para el termociclador es el siguiente: 1 ciclo inicial de 5 minutos a 94°C seguido de 30 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 50-53.5°C, 2 minutos a 72°C y, finalmente, un ciclo de 5 minutos a 72°C (Ajú 2012).

5. Verificación de viabilidad de productos de PCR. Se hizo una electroforesis en gel de agarosa para verificar si los productos de PCR purificados y almacenados por Ajú (2012) eran viables y útiles para este estudio. Se eligieron al azar quince (15) productos de PCR purificados. A los productos que tenían muy poco volumen se les agregó 10 μ l de buffer TE; el gel se corrió por 45 minutos a 85 voltios. Se concluyó que los productos de PCR purificados eran útiles para este estudio.

6. Selección del marcador de ADN de cloroplasto. Se analizaron las secuencias de productos de PCR amplificados de todos los marcadores utilizados por Ajú (2012): *trnS-trnT*, *trnL-trnF*, *rpoCl*, *atpB-rbcL* y *matK*. Este análisis se realizó *in silico* utilizando el programa CLC Main Workbench versión 6.8.4 (CLC Bio). Se generaron mapas de restricción con dicho programa y se identificó la región *trnL-F*, amplificada con el par de primers *trnL-trnFf* y *trnL-trnFr*, como la más polimórfica de las regiones con que trabajó Ajú (2012). Debido a esto se seleccionaron dieciocho secuencias de los productos de amplificación de individuos correspondientes a esta región para realizar el análisis de sitios de restricción.

7. Selección de enzimas de restricción. Para seleccionar las enzimas de restricción se analizaron las secuencias de dieciocho individuos que incluyen las siete especies de *Annona* de interés, utilizando el programa CLC Main Workbench versión 6.8.4 (CLC Bio). Se utilizaron las herramientas de análisis de sitios de restricción de dicho programa para probar un conjunto de cincuenta enzimas populares en todas las secuencias a la vez. Se generó un mapa de restricción que muestra los sitios de corte de cada enzima para cada secuencia y se seleccionaron aquellas enzimas cuyos sitios de corte eran diferentes para cada especie. Estas enzimas son *Sau3AI* y *ApaI*.

8. Digestión de productos de amplificación y visualización de resultados. La digestión *in vivo* de los productos de amplificación se realizó con las enzimas *Sau3AI* y *ApaI*, siguiendo las condiciones recomendadas del fabricante. Los volúmenes de los reactivos de las digestiones se muestran en el Cuadro 1. A cada digestión se le agregó 1 ó 2 μ l de producto de PCR purificado, dependiendo de la intensidad de las bandas obtenidas y se incubó por 4 horas a 37° C. Algunas digestiones se incubaron en bloque y algunas en termociclador, obteniendo resultados satisfactorios en ambos dispositivos.

CUADRO 1. Volúmenes de reactivos de cada digestión realizada con *Sau3AI* y *ApaI* (Promega).

Reactivo	µl
H ₂ O	7.7
Buffer MULTI-CORE	1
BSA	0.1
<i>Sau3AI</i>	0.1
<i>ApaI</i>	0.1

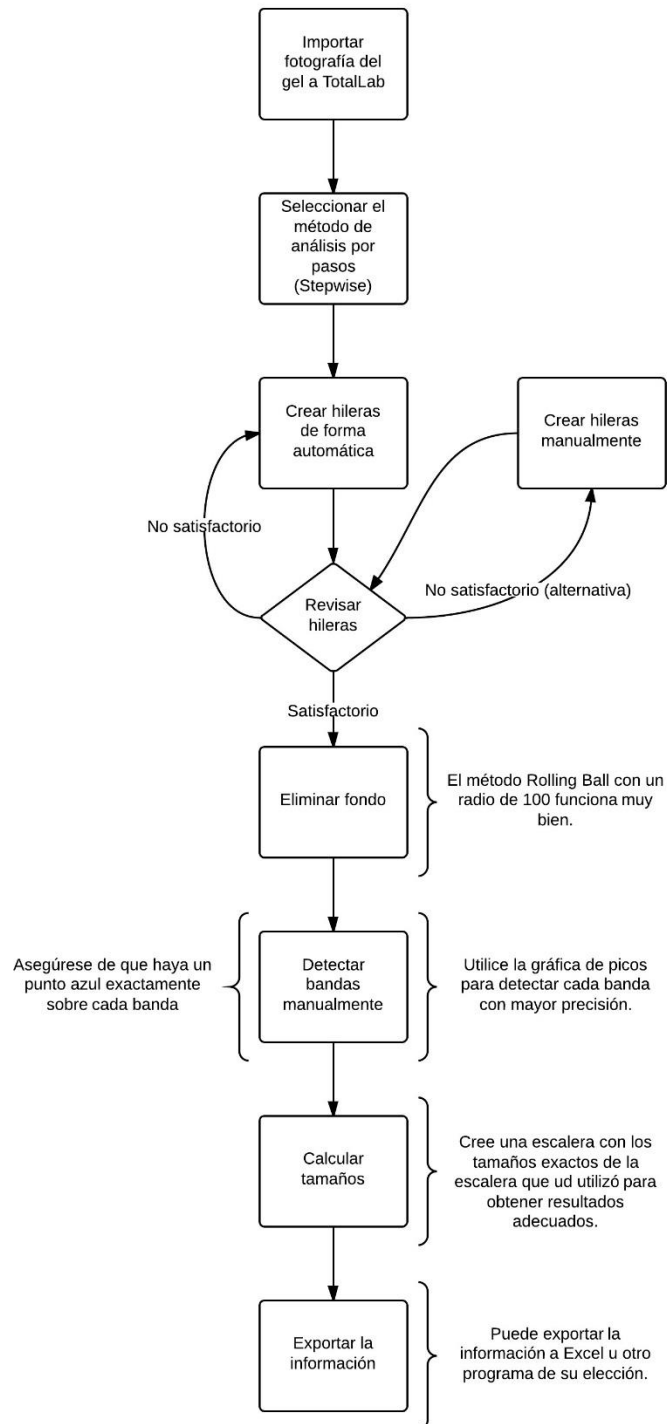
Los resultados se visualizaron por medio de electroforesis de geles de agarosa al 3.0% en TAE 1x teñidos con Gel Red y con fotografías digitales de los perfiles de bandas obtenidos. Las fotografías se tomaron con un UV Transilluminator (UVP). Cada electroforesis corrió por dos horas a un potencial de 90 voltios. Se utilizó buffer TAE 1x fresco para cada corrida para minimizar artefactos y elementos no deseados al visualizar el gel. Por esta misma razón, la cama donde se coloca el gel se lavó vigorosamente y se secó previo a la preparación del mismo. Se cargaron 3 µl de cada producto de digestión en cada pozo del gel.

En total se realizaron trece digestiones con 20 productos de amplificación de especies conocidas y 7 productos de amplificación de especies desconocidas para probar las dos enzimas de restricción, optimizar las condiciones de digestión y de electroforesis, y reconocer y definir, con precisión, el perfil de cada una de las siete especies de interés, y probar su utilidad para identificar muestras desconocidas.

9. Análisis de resultados. Se utilizó el programa NEBcutter versión 2.0 (Vincze *et al.* 2003) para generar geles virtuales que fueron comparados con los geles de agarosa reales para verificar las digestiones (estos geles virtuales se encuentran en el Apéndice A de este informe). Se ingresó cada secuencia al programa y se hizo una digestión personalizada con ambas o sólo una de las enzimas *Sau3AI* y *ApaI*, dependiendo si la secuencia contenía posiciones de corte para ambas enzimas o no. Las opciones para generar cada gel virtual fueron: 135 mm de largo, agarosa NuSieve al 3.0% y una escalera de 100 bp. Se compararon los patrones de bandas y las posiciones de las mismas entre los geles virtuales y reales.

A partir de las electroforesis reales se calculó el tamaño de las bandas del perfil de cada especie utilizando el programa TotalLab Quant versión 1.0.9.0 (TotalLab). El procedimiento específico para realizar este proceso se detalla en el diagrama mostrado en la Figura 4 (los reportes del análisis de cada gel se encuentran en el Apéndice B de este informe). Se utilizó la información de seis geles diferentes para calcular el tamaño promedio de las bandas de cada perfil y para calcular la desviación estándar del tamaño de cada banda.

Figura 4. Diagrama de flujo para procesar geles de agarosa y calcular el tamaño de cada banda en TotalLab Quant versión 1.0.9.0.



III. RESULTADOS

Mediante el análisis *in silico* de mapas de restricción se seleccionaron el marcador *trnL-F* y dos enzimas que permiten identificar efectivamente a cinco de las siete especies de interés. El mapa de la enzima *Sau3AI* (Cuadro 2) muestra que las posiciones de corte son distintas para cinco especies (*A. cherimola*, *A. glabra*, *A. macrophyllata*, *A. muricata* y *A. purpurea*) y prácticamente idénticas para las dos restantes (*A. reticulata* y *A. squamosa*). El mapa de la enzima *ApaI* (Cuadro 3) muestra posiciones de corte que difieren en 100 bp para *A. cherimola* y *A. macrophyllata*, las únicas dos especies que tienen sitios de restricción para esa enzima. Sin embargo, el análisis indica que únicamente cuatro de los ochos individuos de *A. cherimola* tienen estos sitios de restricción. Por sí sola, *ApaI* no provee información importante, pero en combinación con *Sau3AI* permite obtener resultados más robustos.

CUADRO 2. Mapa de restricción con la enzima *Sau3AI*, correspondiente al análisis de dieciocho muestras de *Annona* que incluyen las siete especies de interés.

	Secuencia*	Enzima	Sitio de corte	Cortes	Posiciones de corte
1	GAAch003B			3	323, 352, 607
2	GAAch024B			3	324, 353, 607
3	GAAch058B			3	326, 355, 609
4	GAAch063B			3	377, 406, 660
5	GAAch070B			3	369, 398, 653
6	GAAch085B			3	361, 390, 645
7	GAAch095B			3	376, 405, 659
8	GAAch104B			3	378, 407, 661
9	GAAgl046B			3	325, 354, 608
10	GAAma032B	<i>Sau3AI</i>	<i>gatc</i>	4	305, 334, 592, 641
11	GAAma096B			4	319, 348, 608, 657
12	GAAmu075B			1	653
13	GAAmu082B			1	245
14	GAApu040B			2	199, 507
15	GAAre041B			4	256, 285, 539, 588
16	GAAre076B			4	377, 406, 660, 709
17	GAAre097B			4	380, 409, 663, 712
18	GAAsq030B			4	358, 387, 643, 692

CUADRO 3. Mapa de restricción con la enzima *ApaI*, correspondiente al análisis de seis muestras de *Annona* que incluyen dos especies: *A. cherimola* y *A. macrophyllata*.

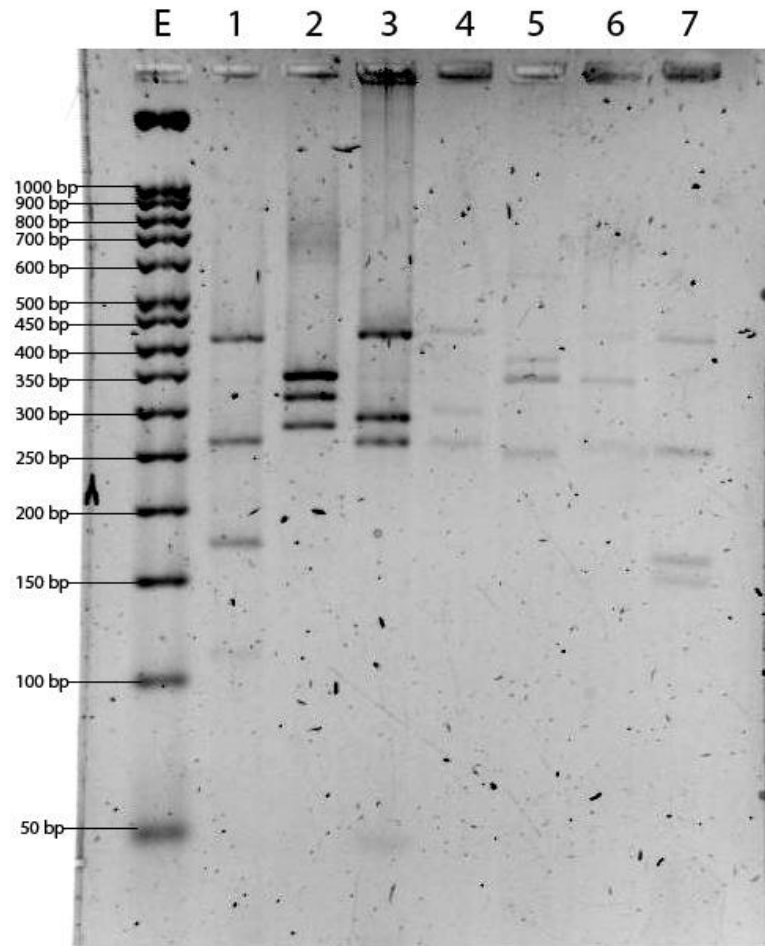
	Secuencia*	Enzima	Sitio de corte	Cortes	Posiciones de corte
1	GAAch024B			1	771
2	GAAch063B			1	823
3	GAAch095B	<i>ApaI</i>	gggccc	1	822
4	GAAch104B			1	824
5	GAAma032B			1	755
6	GAAma096B			1	772

* Leyenda para interpretar el nombre de las secuencias: (G) Guatemala, (A) *Annona*, (Ach) *A. cherimola*, (Agl) *A. glabra*, (Ama) *A. macrophyllata*, (Amu) *A. muricata*, (Apu) *A. purpurea*, (Are) *A. reticulata*, (Asq) *A. squamosa*, (xxx) número de muestra, (B) letra identificadora del marcador utilizado para amplificar el producto de PCR. El largo promedio de las secuencias es de 868 bp.

La digestión con ambas enzimas de los productos de PCR previamente purificados fue exitosa y generó perfiles útiles para distinguir a cinco de las siete especies de interés (Figuras 5, 6 y 7). La información de éste (Figura 5) y cinco geles más fue utilizada para calcular los tamaños de las bandas y así obtener datos tangibles sobre el perfil de cada especie. Los tamaños correspondientes a las bandas del gel que se observa en la Figura 5 se muestran en el Cuadro 4 y los tamaños promedio de las bandas del perfil de cada especie se muestran en el Cuadro 5 junto con la desviación estándar del tamaño de cada banda. Estos pesos promedio también se muestran en las Figuras 6 y 7.

En comparación con el número y tamaño de las bandas que se esperaban obtener, los resultados reales mostraron consistentemente menos bandas. Todas las bandas de menos de 50 bp no se lograron observar y también hubo diferencias entre los pesos moleculares de las bandas esperadas (Cuadro 6) y los que se obtuvieron (Cuadro 5). Se detectaron variaciones en los resultados de las electroforesis que se realizaron a lo largo de este estudio. Un ejemplo de las variaciones en la migración de las bandas de las escaleras de referencia pueden observarse en la Figura 8. Todas las electroforesis se realizaron bajo las mismas condiciones de corrida.

FIGURA 5. Productos de PCR de siete especies de *Annona* digeridos con *Sau3AI* y *ApaI* en un gel de agarosa al 3.0%. (E) Escalera molecular, (1) *A. macrophyllata*, (2) *A. purpurea*, (3) *A. squamosa*, (4) *A. reticulata*, (5) *A. muricata*, (6) *A. glabra*, (7) *A. cherimola*. Los patrones de (3) *A. squamosa* y (4) *A. reticulata* son idénticos.



CUADRO 4. Tamaños (en pares de bases) correspondientes a las bandas que se muestran en la Figura 5 en las hileras con el mismo número.

Banda	1 (bp)	2 (bp)	3 (bp)	4 (bp)	5 (bp)	6 (bp)	7 (bp)
1	424	350	430	435	384	339	424
2	268	317	295	302	344	270	257
3	175	288	268	266	253	212	162
4							147

FIGURA 6. Perfiles de RFLP para: (A) *A. macrophyllata*, (B) *A. purpurea*, (C) *A. reticulata*, (D) *A. squamosa*. Cada hilera corresponde a una digestión distinta. Se muestran los tamaños promedio (en pares de bases).

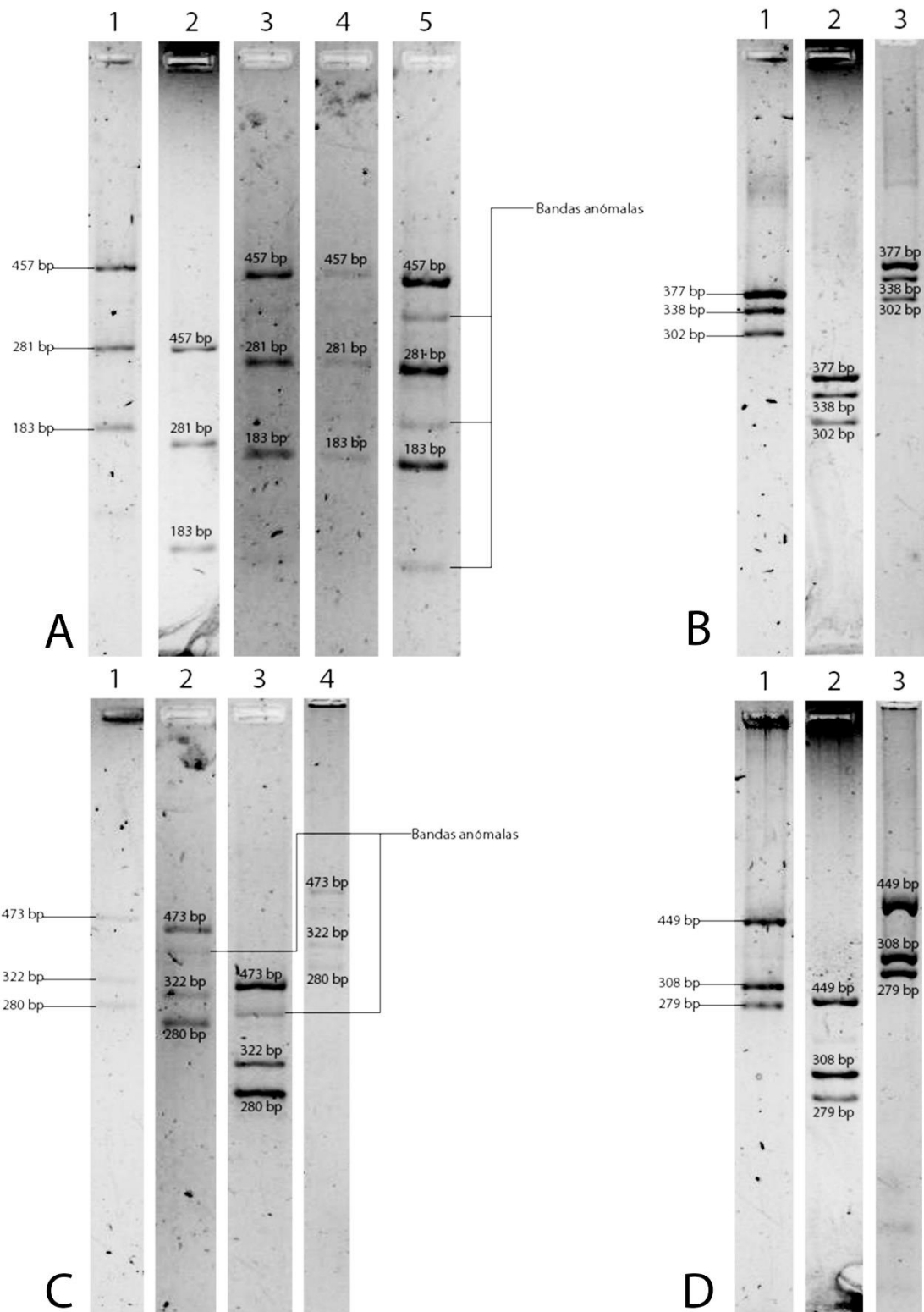
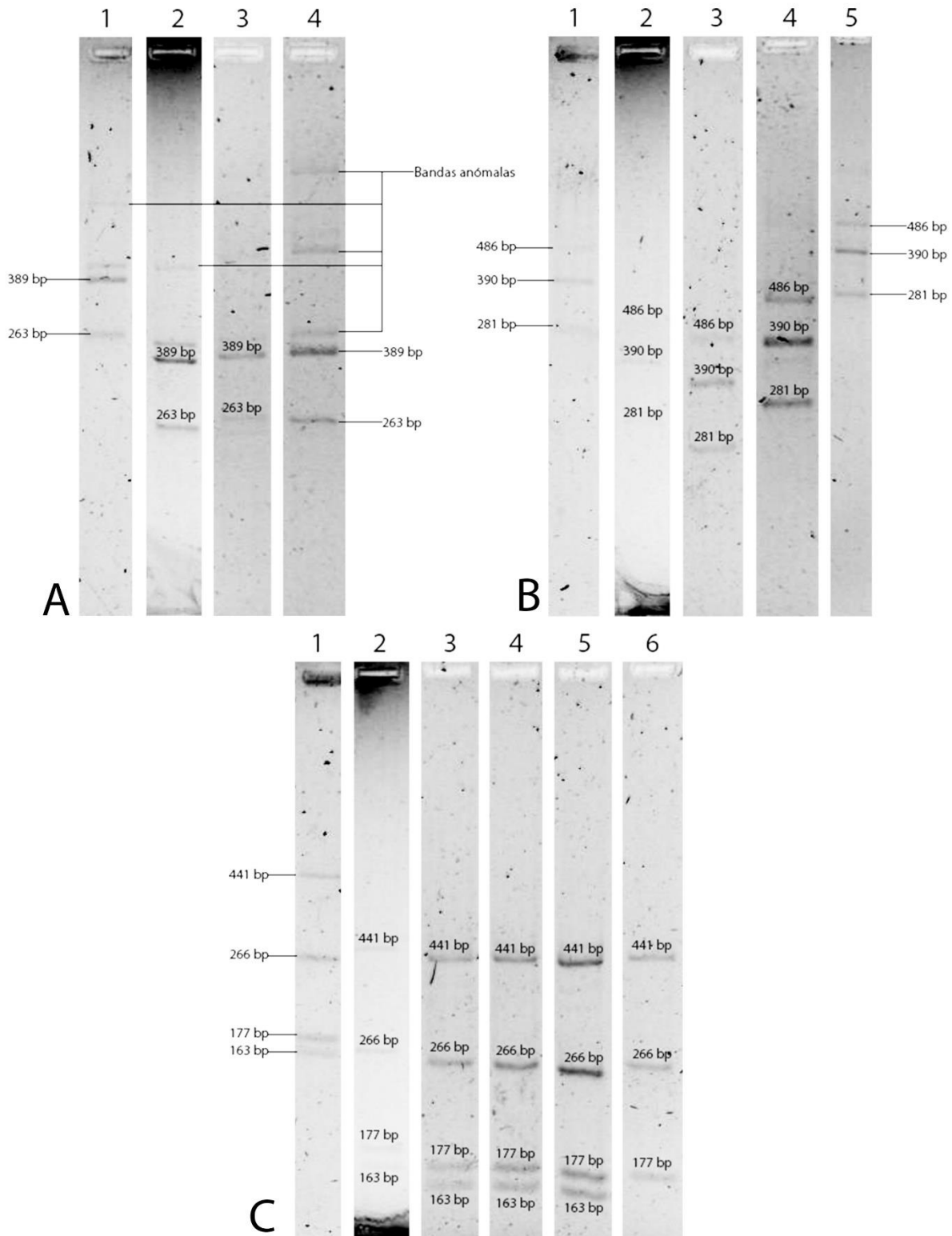


FIGURA 7. Perfiles de RFLP para: (A) *A. muricata*, (B) *A. glabra*, (C) *A. cherimola*. Cada hilera corresponde a una digestión distinta, excepto en (C) donde las hileras 3 a 6 corresponden a una misma digestión. Se muestran los tamaños promedio (en pares de bases).



Se analizaron siete productos de PCR cuya especie era desconocida para verificar la utilidad real de este método. El número y tamaño de las bandas del análisis de cada uno de estos productos de PCR se muestran en el Cuadro 7. Se lograron identificar exitosamente las siete muestras desconocidas.

CUADRO 5. Tamaños promedio (en pares de bases) y su desviación estándar correspondientes a las bandas que conforman el perfil de cada especie.

Banda	1	±	2	±	3	±	4	±	5	±	6	±	7	±
1	457	27	377	32	449	26	473	35	389	6	486	27	441	11
2	281	9	338	24	308	12	322	16	263	8	390	20	266	8
3	183	6	302	16	279	10	280	11			281	9	177	8
4													163	11

(1) *A. macrophyllata*, (2) *A. purpurea*, (3) *A. squamosa*, (4) *A. reticulata*, (5) *A. muricata*, (6) *A. glabra*, (7) *A. cherimola*.

CUADRO 6. Tamaños correspondientes (en pares de bases) a las bandas esperadas de acuerdo al análisis de geles virtuales.

Banda	1*	2	3	4*	5*	6	7
1	312	308	358	379	558	325	378
2	259	199	256	254	241	298	254
3	122	149	230	230		254	163
4	112		49	49		29	130
5	49		29	29			29
6	29						

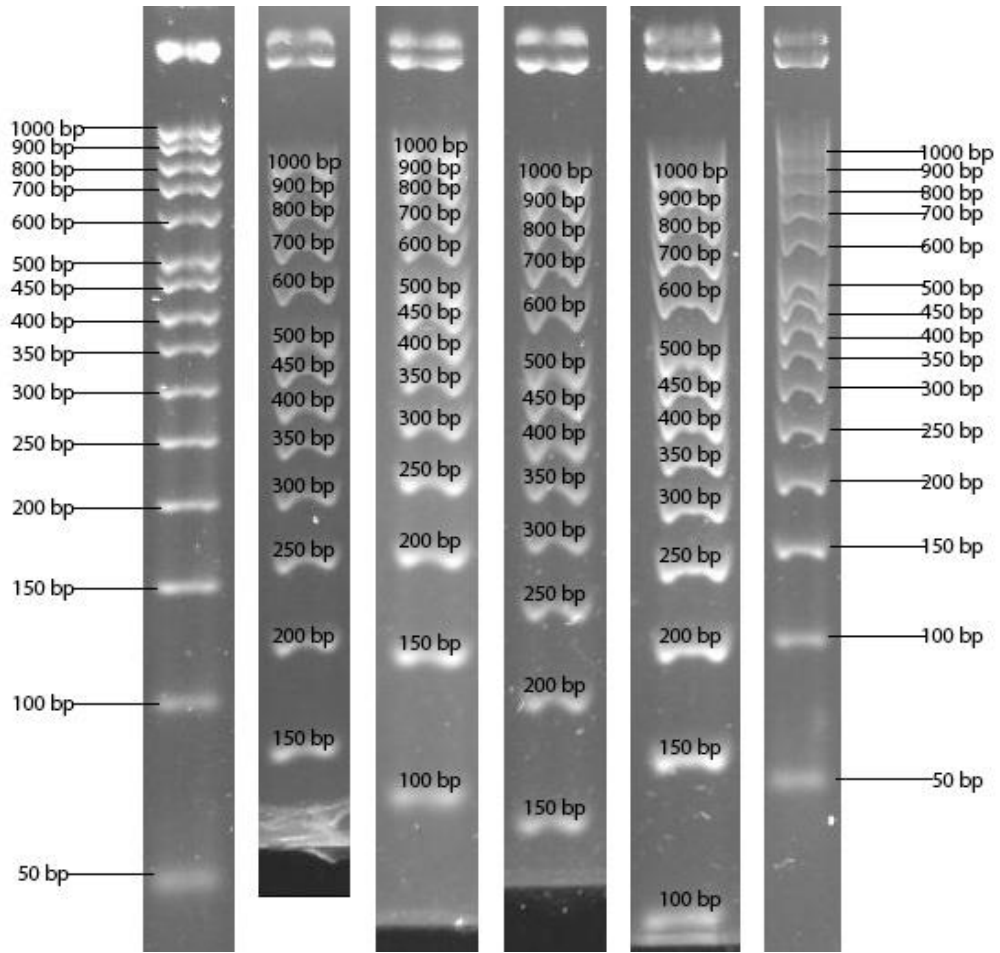
(1) *A. macrophyllata*, (2) *A. purpurea*, (3) *A. squamosa*, (4) *A. reticulata*, (5) *A. muricata*, (6) *A. glabra*, (7) *A. cherimola*. *Estos son tamaños promedio pues se obtuvieron a partir del análisis de dos o más geles correspondientes a secuencias de dos o más individuos de la misma especie.

CUADRO 7. Tamaños de las bandas (en pares de bases) de las siete muestras desconocidas con las que se probó la utilidad real de este método.

Banda	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7
1	445	450	447	450	478	471	497
2	274	275	268	268	385	288	403
3	183	185	180	177	277	186	288
4	172	172	167				189

(D1) *A. cherimola*, (D2) *A. cherimola*, (D3) *A. cherimola*, (D4) *A. cherimola*, (D5) *A. glabra*, (D6) *A. macrophyllata*, (D7) *A. macrophyllata*.

FIGURA 8. Comparación de migración de bandas de la misma escalera molecular (Promega, 50 bp) en diferentes geles de agarosa a la misma concentración (3.0%) y mismas condiciones de corrida (TAE 1x fresco, 2 horas a 90 voltios).



IV. DISCUSIÓN

Los mapas de restricción generados con CLC Main Workbench fueron cruciales para decidir qué marcador (de los disponibles) y qué enzimas eran útiles para este estudio. El análisis de los mapas sugiere que casi todos los marcadores que utilizó Ajú (2012) amplifican regiones del genoma cloroplastidial altamente conservadas y que no poseen suficiente variabilidad para utilizar enzimas de restricción. Esto se debe a que, en las regiones amplificadas con dichos marcadores, la mayoría o todas las enzimas de restricción populares (cincuenta enzimas) tienen los mismos sitios de corte, haciéndolas inservibles para alcanzar los objetivos de este estudio. Por esta razón fueron descartadas las regiones *rpoClint*, *atpB-rbcL* y *matK*. La región *trnL-trnF* fue la única suficientemente polimórfica para este análisis debido a que tiene sitios de corte distintos de *Sau3AI* y *ApaI* para cinco de las siete especies a analizar. La región *trnS-trnT* también podría ser adecuada, pero no se contó con secuencias de fragmentos amplificados de esta región de todas las especies para producir un mapa de restricción completo, por lo que también fue descartada.

Tras optimizar los procesos de digestión con las enzimas *Sau3AI* y *ApaI* y de electroforesis se obtuvieron los perfiles que se observan en las Figuras 5, 6 y 7. Estos perfiles son consistentes y reproducibles. En las Figuras 6 y 7 se puede observar que cada patrón de bandas es distinto a los demás, excepto los de *A. squamosa* y *A. reticulata*, que son idénticos entre sí, pero diferentes al resto. Esto sugiere que las enzimas *Sau3AI* y *ApaI* generan perfiles de RFLP que permiten distinguir entre cinco de las siete especies y entre estas cinco y las dos que poseen el mismo patrón de bandas.

Los patrones (número y tamaño aproximado de las bandas) son consistentes porque son fácilmente reconocibles en diferentes digestiones y geles de agarosa. En las Figuras 6 y 7, cada hilera corresponde a una digestión distinta (a menos que se indique lo contrario), y sin embargo es evidente que, aunque migren más o menos,

los patrones se mantienen de una digestión y electroforesis a otra. Por lo tanto, los patrones son reproducibles.

La movilidad de los ácidos nucleicos en geles es afectada por varios factores: concentración del gel, la calidad de la agarosa, condiciones del buffer, la capacidad de amortiguamiento del buffer, el voltaje utilizado, el grosor del gel, el tamaño de los pozos, el tamaño y conformaciones de los fragmentos de ADN. La secuencia y composición de las bases no son factores que tengan un efecto muy importante (Ven y Rani 2012).

A pesar de que se mantuvo la consistencia de algunas de estas variables entre las diferentes electroforesis, específicamente el voltaje, tipo y condición del buffer y tiempo de corrida, hubo variaciones en la migración de los fragmentos de ADN. La migración de fragmentos probablemente se vio afectada al agotarse la capacidad de amortiguamiento del TAE 1x, evidenciado por el cambio de color de los colorantes del loading dye de azul/violeta a amarillo (Sambrook y Russell 2001).

Otro factor que pudo haber afectado es el grosor de los diferentes geles. Este variaba dependiendo de la cama utilizada. El volumen del gel era el mismo, pero una cama más corta produce un gel más grueso que una cama más larga. Un gel más grueso reduce la capacidad de resolución de la agarosa. Lo mismo sucede con el tamaño de los pozos; se utilizaron peines de puntas gruesas, que facilitan la carga de ADN y la visualización de fragmentos grandes, pero reducen la visibilidad de los fragmentos más pequeños. Estas variaciones en la migración de los fragmentos introdujeron pequeñas diferencias al momento de calcular el tamaño de las bandas con TotalLab. Sin embargo se obtuvieron tamaños consistentes de una digestión a otra con desviaciones estándar de máximo 30 bp (véase el Cuadro 5).

Todos los fragmentos de menos de 100 bp no se lograron visualizar. Hay tres posibles razones para esto. La primera es que estos fragmentos salieron del gel por el largo tiempo de corrida de la electroforesis (2 horas). La segunda es que el

tamaño de estos fragmentos está justamente por debajo del poder de resolución de los geles de agarosa convencionales y por eso son difíciles de observar. Finalmente hay que tomar en consideración que en el tercio inferior de los geles de agarosa se reduce la resolución debido a la dispersión y difusión de fragmentos (Ven y Rani 2012). Sin embargo esto no es crítico pues son fragmentos comunes a varias de las especies (Cuadro 6) y no son cruciales para distinguir una especie de otra.

En *A. macrophyllata*, *A. reticulata* y *A. muricata* (Figuras 6 y 7) se observaron bandas adicionales en algunas de las digestiones, pero éstas no se tomaron en cuenta para calcular los tamaños promedio. Éstas se consideraron bandas anómalas porque no coinciden con las bandas obtenidas regularmente y con el tamaño de las bandas esperadas. Estas bandas anómalas se deben, probablemente, a que en el momento cuando se realizaron las digestiones donde éstas aparecieron, el producto de PCR ya se encontraba más degradado o empezaba a degradarse, generando fragmentos adicionales que aparecieron en el gel como bandas adicionales. Esta degradación sucedió porque los productos de PCR estuvieron almacenados inadecuadamente (4° C) más de doce meses antes de ser utilizados para este análisis.

En el caso de la banda de alrededor de 1000 bp que se observó en una de las digestiones de *A. muricata*, el peso sugiere que posiblemente se realizó una digestión incompleta, que un fragmento no fue digerido y apareció como una banda de gran peso molecular en el gel. Para esta especie se esperaba obtener solamente dos bandas, pero se observaron dos bandas adicionales, pero diferentes, para cada producto de PCR correspondiente a cada una de las dos muestras disponibles de esta especie. Estas también se consideraron bandas anómalas resultado de degradación de los productos de PCR o digestiones incompletas y no se tomaron en cuenta para calcular los tamaños promedio.

Estos resultados en conjunto con el análisis de posiciones de corte en los mapas de restricción (Cuadro 2, filas 12 y 13) sugieren que inicialmente uno de los dos

individuos de *A. muricata* fue mal identificado a partir de la morfología. Esta discrepancia también podría corresponder a resultados pobres de la secuenciación, haciendo difícil el proceso de alineamiento de secuencias de avance y reversa, produciendo así una región contigua no óptima para uno o los dos individuos, afectando el análisis con los programas bioinformáticos. Finalmente, una razón menos probable, pero posible, es que en esta especie haya mayor variabilidad en esta región del genoma cloroplastidial.

NEBcutter no es una herramienta adecuada para obtener un panorama general de los sitios de restricción de muchas muestras, pues sólo permite el análisis de una muestra a la vez y no se pueden ver los resultados de varios análisis simultáneamente. Sin embargo este último programa fue más útil para generar los geles virtuales que proveyeron información sobre los tamaños de las bandas esperadas, pues provee más opciones al momento de generarlos.

Hubo variaciones entre las bandas obtenidas y las bandas esperadas de cada especie. Esto puede deberse a que los cálculos de los geles virtuales toman en cuenta la utilización de una agarosa de alta resolución, además de que estos son datos interpolados en base a información de referencia que posee New England Biolabs (Vincze *et al.* 2003). Adicionalmente, debemos tomar en cuenta que la secuencia con la que se generaron los geles virtuales no corresponde exactamente a la totalidad del fragmento amplificado, siendo este más grande que la región contigua óptima, y por lo tanto tiene sentido que las bandas obtenidas sean de mayor tamaño. Los resultados de los geles virtuales dependen en gran medida de la calidad de las secuencias que se hayan generado, por lo que la calidad de los productos de PCR purificados también influye en esos resultados. Mejores productos de PCR purificados producirán mejores secuencias, obteniendo así geles virtuales más precisos.

Los resultados obtenidos sugieren que la digestión de fragmentos amplificados de la región *trnL-F* con las enzimas *Sau3AI* y *ApaI* genera perfiles de RFLP que

permiten distinguir entre cinco especies de anonas (*A. cherimola*, *A. glabra*, *A. macrophyllata*, *A. muricata* y *A. purpurea*) y entre estas cinco y dos especies más (*A. reticulata* y *A. squamosa*) que tienen perfiles de RFLP idénticos. Se realizó una primera prueba del método aquí propuesto con siete productos de PCR cuya especie era desconocida. No se contaba con la secuencia de ADN de estos productos, y por lo tanto la única forma de identificarlos era con el análisis de RFLP. El análisis fue exitoso al poder identificarse los siete productos de PCR (véase el Cuadro 7), dándole robustez a este método. Se lograron cumplir los objetivos de este estudio y, aunque todavía queda realizar más pruebas y verificar el método utilizando productos de PCR frescos, se ha sentado la base de un método potencialmente útil para futuros trabajos de investigación con anonas.

V. CONCLUSIONES

De los cinco marcadores de cloroplasto evaluados, la región *trnL-trnF* es el marcador cuya variabilidad permitió generar perfiles de RFLP para las siete especies de anonas evaluadas.

Las enzimas de restricción *Sau3AI* y *ApaI* generan perfiles de RFLP que permiten distinguir entre *A. cherimola*, *A. glabra*, *A. macrophyllata*, *A. muricata* y *A. purpurea*, y entre éstas y *A. squamosa* y *A. reticulata*. Los patrones de RFLP obtenidos con estas enzimas son consistentes y reproducibles.

Los patrones de RFLP de *A. squamosa* y *A. reticulata* obtenidos con *Sau3AI* y *ApaI* son idénticos.

Programas bioinformáticos como CLC Main Workbench y NEBcutter son útiles para generar información *in silico* que sirve como el punto de partida de un trabajo de investigación de esta naturaleza.

CLC Main Workbench es útil para hacer análisis de sitios de restricción a gran escala. NEBcutter es útil para hacer análisis muestra por muestra y para la generación de geles virtuales. Son herramientas complementarias.

Los geles virtuales dependen de la calidad de las secuencias que se hayan generado, por lo que la calidad de los productos de PCR purificados también influye en esos resultados. Mejores productos de PCR purificados producirán mejores secuencias, obteniendo así geles virtuales más precisos.

La calidad de los geles reales y la visualización correcta de resultados dependen de la rigurosidad con que se controlen las variables de cada electroforesis.

VI. RECOMENDACIONES

Realizar una digestión con *Sau3AI* y *TaqI* para distinguir entre *A. reticulata* y *A. squamosa*. Analizar estos resultados en geles de agarosa de alta resolución para poder distinguirlos del resto.

Los geles de agarosa deben ser lo más largos que sea posible, poco gruesos y se deben utilizar peines con puntas pequeñas para maximizar la resolución de fragmentos pequeños.

Utilizar siempre la misma cámara de electroforesis o una del mismo tipo para mejorar la capacidad de comparación entre diferentes geles.

Utilizar buffer fresco para cada electroforesis si la condición del buffer afecta la visualización y comparación de resultados.

Al tomar las fotografías de los geles, procurar siempre utilizar la misma longitud focal y sensibilidad del lente y transiluminador, respectivamente.

Realizar digestiones con productos de PCR frescos para verificar todos los perfiles obtenidos a lo largo de este estudio.

Realizar todas las digestiones en el mismo dispositivo, ya sea en un termociclador o en bloque.

VII. LITERATURA CITADA

Ajú, J. 2012. *Caracterización molecular por marcadores de cloroplasto en especies de Annona (Annonaceae) en Guatemala*. Trabajo de Graduación de Licenciatura en Biología, Departamento de Biología, Universidad del Valle de Guatemala, Guatemala. 124 pp.

Aranguren-Méndez, J., R. Román-Bravo, W. Isea, Y. Villasmil y J. Jordana. 2005. *Los microsatélites (STR's), marcadores moleculares de ADN por excelencia para programas de conservación: una revisión*. Archivos Latinoamericanos de Producción Animal 13(1):1-6.

Chízmar, C. 2009. *Plantas comestibles de Centroamérica*. INBio. Santo Domingo de Heredia, Costa Rica. 360 pp.

Cruz, E. y H. Deras. 2000. *Colecta y establecimiento de anonáceas en El Salvador*. Agronomía Mesoamericana 11(2):91-95.

FAO/IAEA. 2002. *Mutant Germplasm Characterization using Molecular Markers, A Manual*. International Atomic Energy Agency. Vienna. 87 pp.

Hernández J. y J. León. 1992 *op. cit.* En: García, S. 2009. *Caracterización agromorfológica de frutos de cuatro especies de Annona en los departamentos de Santa Rosa y Jutiapa*. Trabajo de Graduación de Licenciatura en Ingeniería Agrónoma, Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala. 94 pp.

Jarne, P. y P. Lagoda. 1996. *Microsatellites, from molecules to populations and back*. Tree 11(10):424-429.

Lee, H., H. Park, S. Cho, G. Bai y S. Kim. 2000. *Species identification of mycobacteria by PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism of the rpoB gene*. Journal of Clinical Microbiology 38:2966-2971.

Maas P., E. Mennega y L. Westra. 1994 *op. cit.* En: Murillo-A, J. 2001. *Las Annonaceae de Colombia*. Biota Colombiana 2(1):49-58.

Martínez, J. 1995. *Informe nacional para la conferencia técnica internacional de la FAO sobre los recursos fitogenéticos*. FAO. Ciudad de Guatemala. Guatemala. 58 pp.

Murillo-A, J. 2001. *Las Annonaceae de Colombia*. Biota Colombiana 2(1):49-58.

Newton, A. 2008. *Conservation of tree species through sustainable use: how can it be achieved in practice?* Oryx 42(2):195-205.

Oldfield, S. 2008. *Choices for tree conservation*. Oryx 42(2):159-160.

Parani, M., K. Rajesh, M. Lakshmi, L. Parducci, A.E. Szmidt y A. Parida. 2001. *Species identification in seven small millet species using polymerase chain reaction – restriction fragment length polymorphism of trnS-psbC gene region*. Genome 44:495-499.

Parker, T. 2008. *Trees of Guatemala*. The Tree Press. Minneapolis, Minnesota. 1033 pp.

Paxinos, E., C. Mcintosh, K. Ralls y R. Fleischer. 1997. *A noninvasive method for distinguishing among canid species: amplification and enzyme restriction of DNA from dung*. Molecular Ecology 6:483-486.

Prado, J. 2007. *Conservation by cultivation: linkages between an endangered endemic fir (Abies guatemalensis Rehder) and peasant economies in the Guatemalan Western Highlands*. Trabajo de Graduación para Doctorado. Universidad de Copenhague. Copenhague. 170 pp.

Provan, J., W. Powell y P.M. Hollingsworth. 2001. *Chloroplast microsatellites: new tools for studies in plant ecology and evolution*. Trends in Ecology & Evolution 16(3):142-147.

Russell, V.J., G.L. Hold, S.E. Pryde, H. Rehbein, J. Quinteiro, M. Rey-Mendez, C.G. Sotelo, R.I. Pérez-Martin, A.T. Santos y C. Rosa. 2000. *Use of Restriction Fragment Length Polymorphism to distinguish between salmon species*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 48:2184-2188.

Sambrook, J. y D. Russell. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York. 2344 pp.

Selkoe, K. y R. Toonen. 2006. *Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers*. Ecology Letters 9:615-629.

Stanley, P. y J. Steyermark. 1946. *Flora of Guatemala*. Chicago Natural History Museum. Chicago. 488 pp.

Taberlet, P., L. Gielly, G. Pautou y J. Bouvet. 1991. *Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA*. Plant Molecular Biology 17:1105-1109.

Taberlet, P., E. Coissac, F. Pompanon, L. Gielly, C. Miquel, A. Valentini, T. Vermaat, G. Corthier, C. Brochmann y E. Willerslev. 2007. *Power and limitations of the chloroplast trnL (UAA) intron for plant DNA barcoding*. Nucleic Acids Research 35(3):e14.

van Zonneveld, M., X. Scheldeman, P. Escibano, M.A. Viruel, P. Van Damme, W. Garcia, C. Tapia, J. Romero, M. Siguéñas y J.I. Hormaza. 2012. *Mapping genetic diversity of Cherimoya (Annona cherimola Mill.): Application of spatial analysis for conservation and use of plant genetic resources*. Plos One 7(1):e29845.

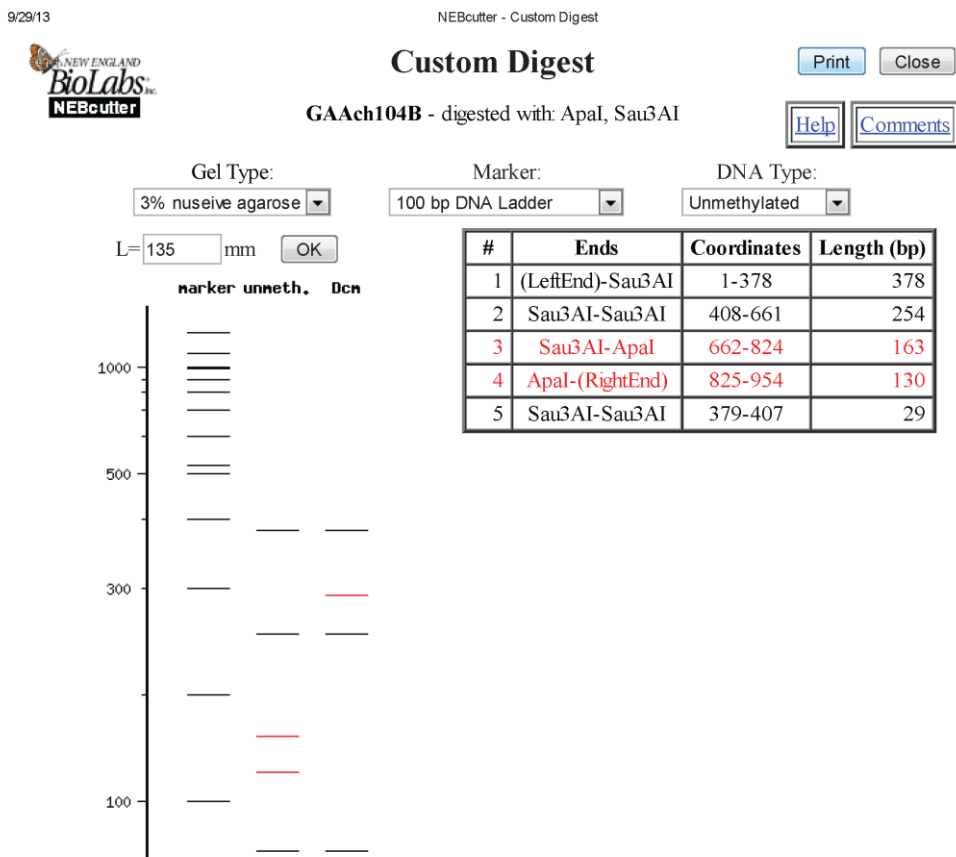
Ven, S. y Rani, A. 2012. *Discriminatory power of agarose gel electrophoresis in DNA fragments analysis*. *Gel Electrophoresis – Principles and Basics*. InTech. Malasia. 346 pp.

Vincze, T., J. Posfai y R. Roberts. 2003. *NEBcutter: a program to cleave DNA with restriction enzymes*. *Nucleic Acids Research* 31:3688-3691.

VIII. APÉNDICES

A. Geles virtuales generados con NEBcutter versión 2.0

1. Muestra GAAch104B – *A. cherimola*



The virtual gel was generated by interpolating experimental data. See [details](#).

2. Muestra GAAgl046B – *A. glabra*

9/29/13

NEBcutter - Custom Digest



Custom Digest

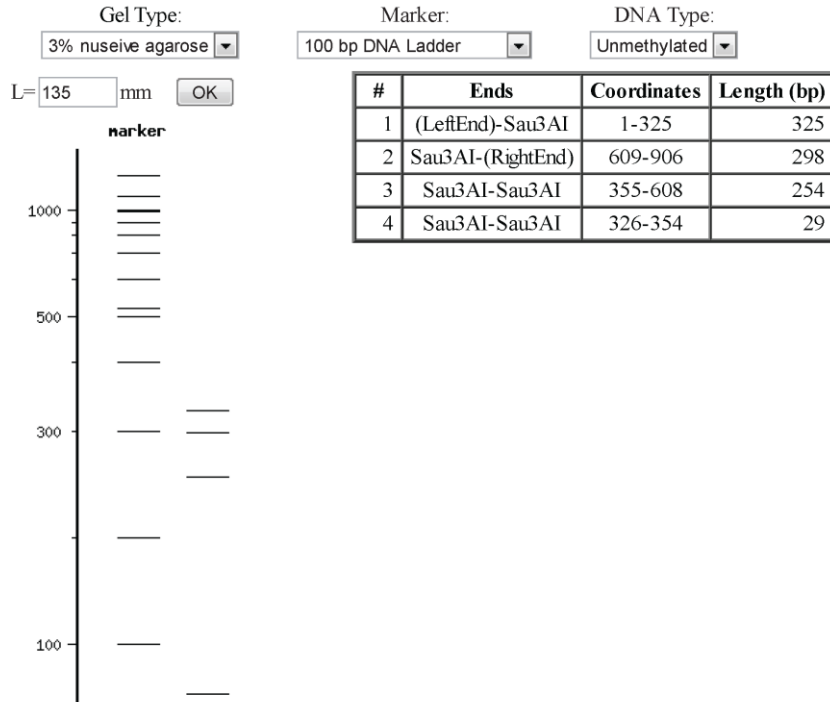
Print

Close

GAAgl046B - digested with: Sau3AI

Help

Comments



The virtual gel was generated by interpolating experimental data. See [details](#).

3. Muestra GAama032B – *A. macrophyllata*

9/29/13

NEBcutter - Custom Digest



Custom Digest

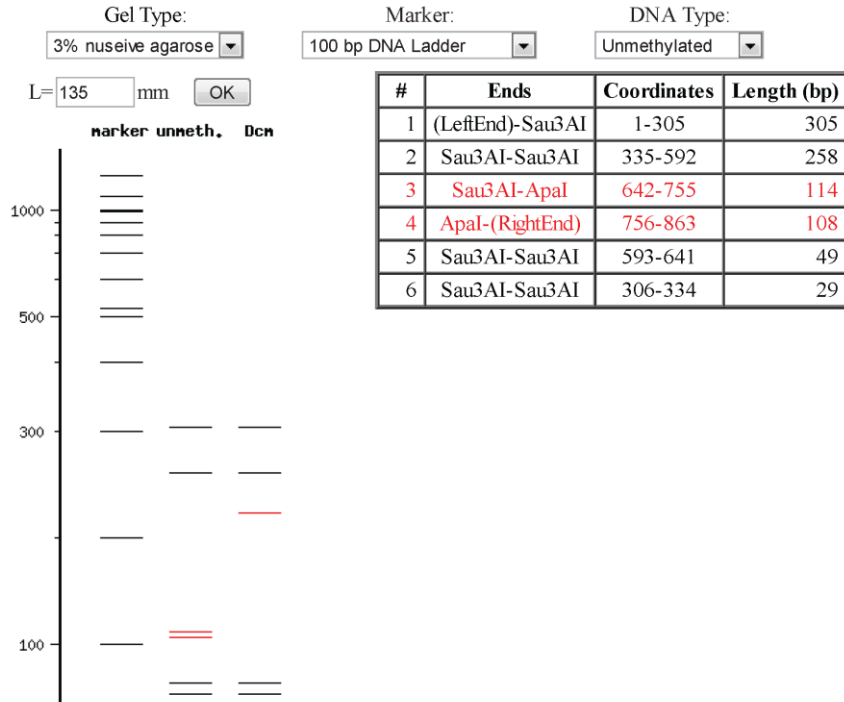
Print

Close

GAama032B - digested with: Apal, Sau3AI

Help

Comments



The virtual gel was generated by interpolating experimental data. See [details](#).

4. Muestra GAAMA096B – *A. macrophyllata*

9/29/13

NEBcutter - Custom Digest



Custom Digest

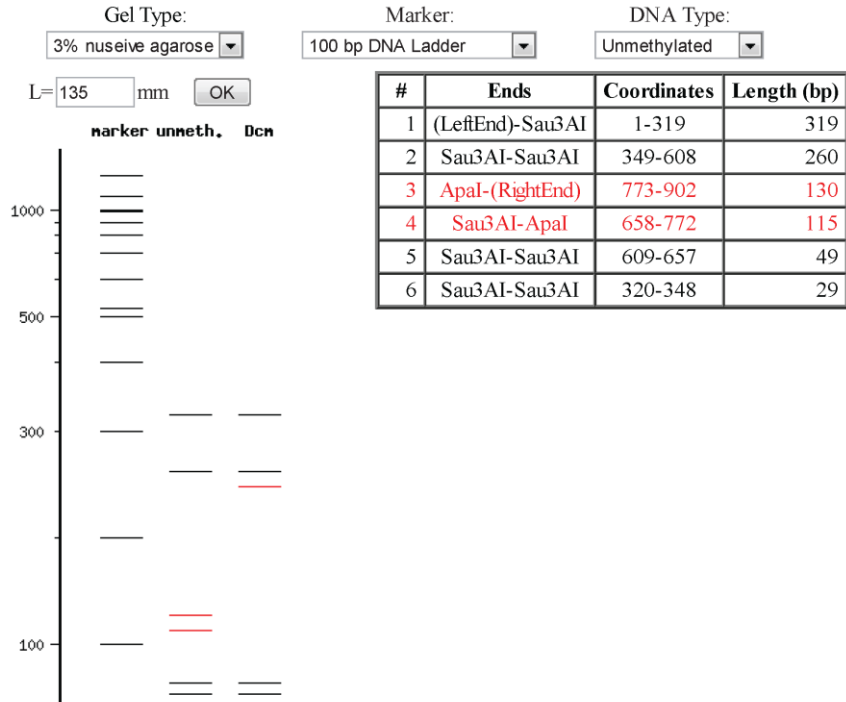
Print

Close

GAAMA096B - digested with: ApaI, Sau3AI

Help

Comments



The virtual gel was generated by interpolating experimental data. See [details](#).

5. Muestra GAAMu075B – *A. muricata*

9/29/13

NEBcutter - Custom Digest



Custom Digest

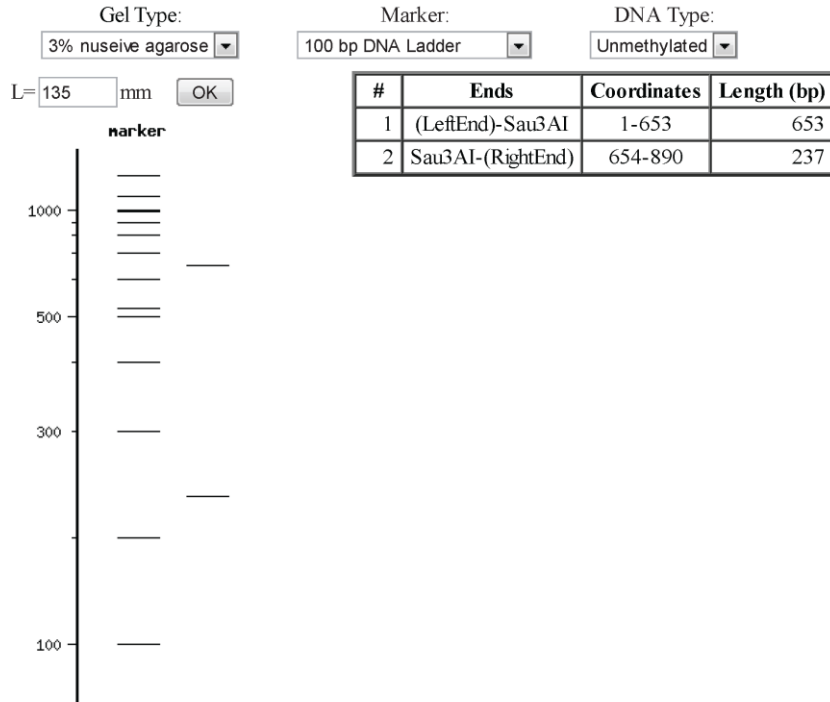
Print

Close

GAAMu075B - digested with: Sau3AI

Help

Comments



The virtual gel was generated by interpolating experimental data. See [details](#).

6. Muestra GAAMu082B – *A. muricata*

9/29/13

NEBcutter - Custom Digest



Custom Digest

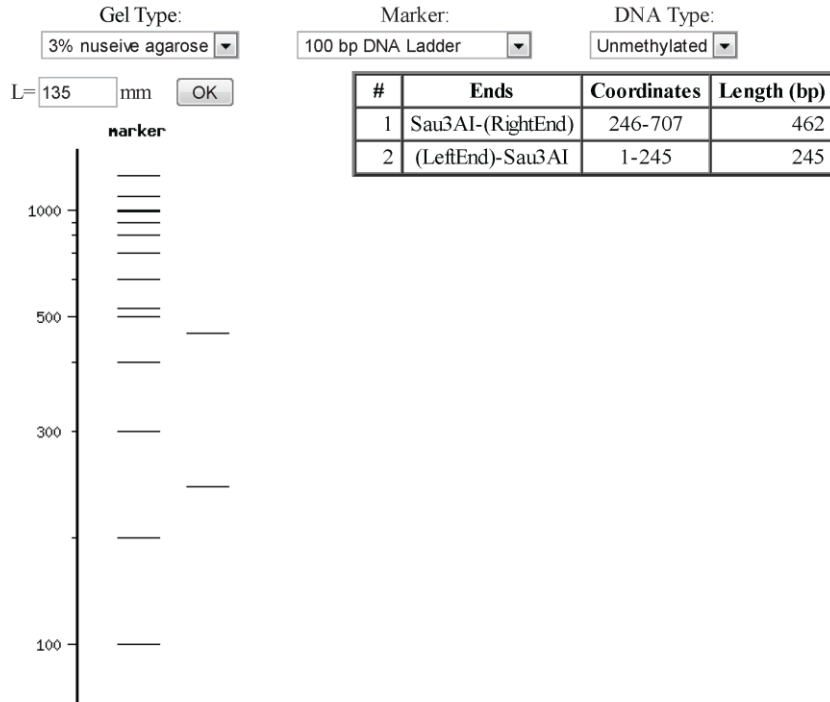
Print

Close

GAAMu082B - digested with: Sau3AI

Help

Comments



The virtual gel was generated by interpolating experimental data. See [details](#).

7. Muestra GAApu040B – *A. purpurea*

9/29/13

NEBcutter - Custom Digest



Custom Digest

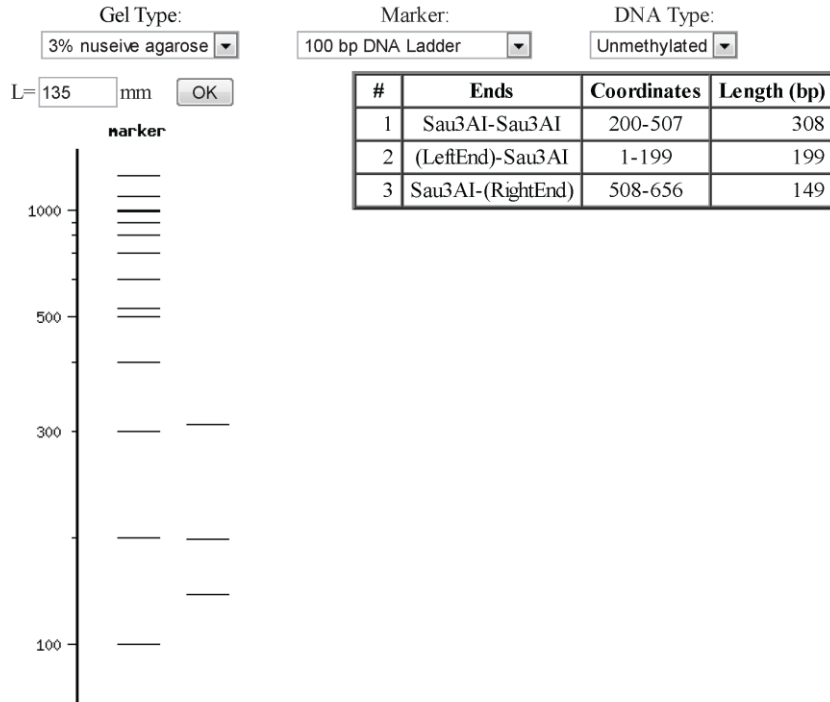
Print

Close

GAApu040B - digested with: Sau3AI

Help

Comments



The virtual gel was generated by interpolating experimental data. See [details](#).

8. Muestra GAAre041B – *A. reticulata*

9/29/13

NEBcutter - Custom Digest



Custom Digest

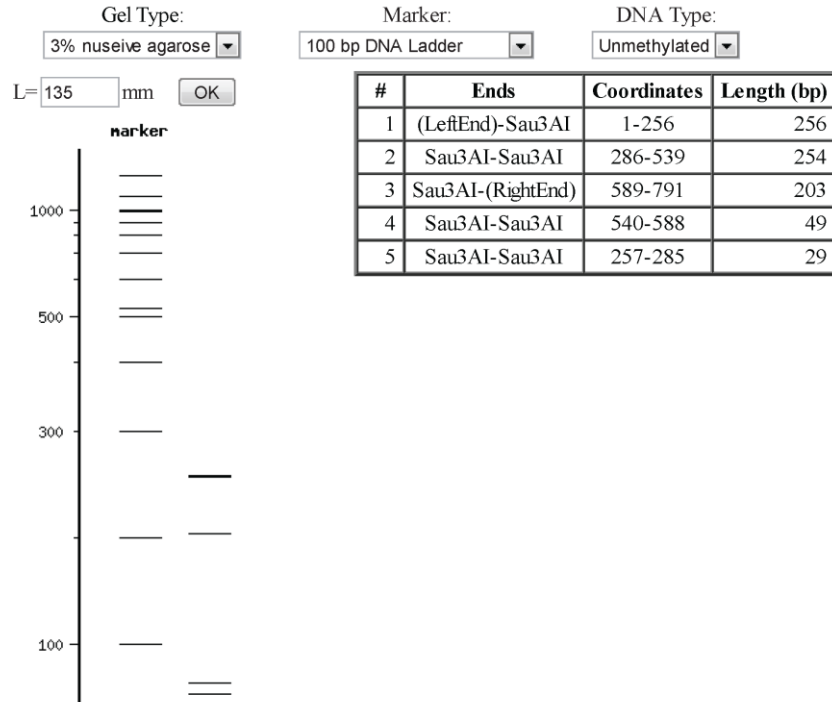
Print

Close

GAAre041B - digested with: Sau3AI

Help

Comments



The virtual gel was generated by interpolating experimental data. See [details](#).

9. Muestra GAAre076B – *A. reticulata*

9/29/13

NEBcutter - Custom Digest



Custom Digest

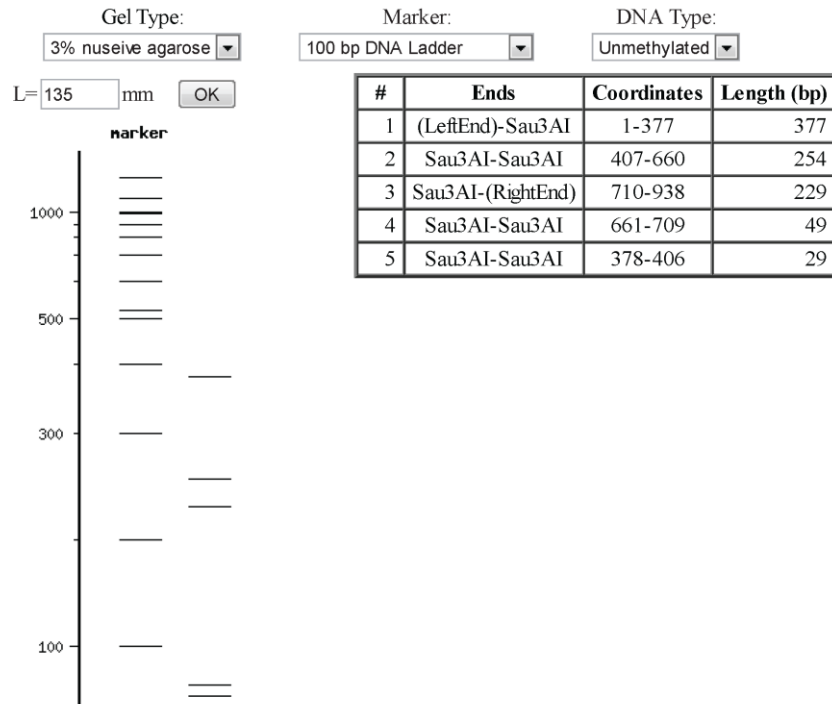
Print

Close

GAAre076B - digested with: Sau3AI

Help

Comments



The virtual gel was generated by interpolating experimental data. See [details](#).

10. Muestra GAAre097B – *A. reticulata*

9/29/13

NEBcutter - Custom Digest



Custom Digest

Print

Close

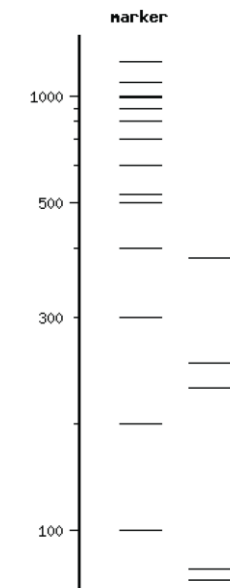
GAAre097B - digested with: Sau3AI

Help

Comments

Gel Type: 3% nuseive agarose
 Marker: 100 bp DNA Ladder
 DNA Type: Unmethylated

L= 135 mm OK



#	Ends	Coordinates	Length (bp)
1	(LeftEnd)-Sau3AI	1-380	380
2	Sau3AI-Sau3AI	410-663	254
3	Sau3AI-(RightEnd)	713-943	231
4	Sau3AI-Sau3AI	664-712	49
5	Sau3AI-Sau3AI	381-409	29

The virtual gel was generated by interpolating experimental data. See [details](#).

11. Muestra GAAsq030B – *A. squamosa*

9/29/13

NEBcutter - Custom Digest



Custom Digest

Print

Close

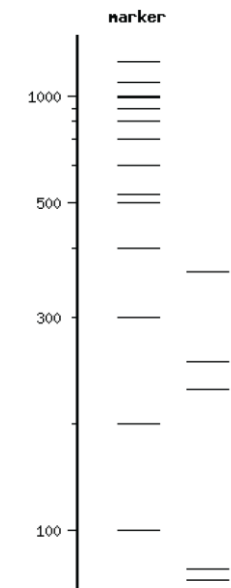
GAAsq030B - digested with: Sau3AI

Help

Comments

Gel Type: 3% nuseive agarose
 Marker: 100 bp DNA Ladder
 DNA Type: Unmethylated

L= 135 mm OK



#	Ends	Coordinates	Length (bp)
1	(LeftEnd)-Sau3AI	1-358	358
2	Sau3AI-Sau3AI	388-643	256
3	Sau3AI-(RightEnd)	693-922	230
4	Sau3AI-Sau3AI	644-692	49
5	Sau3AI-Sau3AI	359-387	29

The virtual gel was generated by interpolating experimental data. See [details](#).

B. Reportes de geles de agarosa generados con TotalLab Quant versión 1.0.9.0

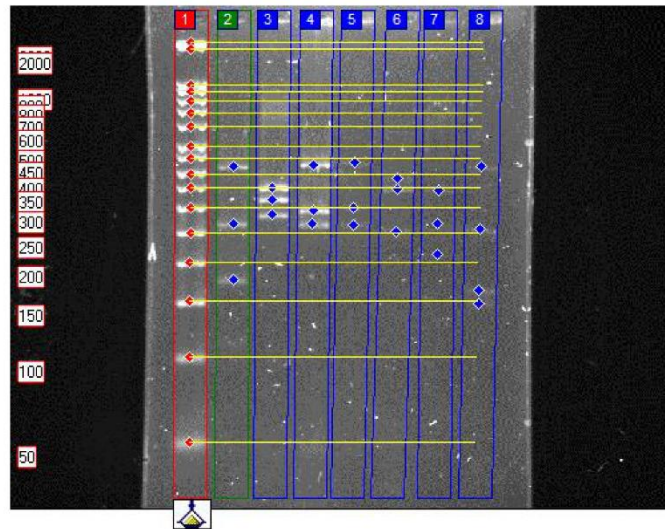
1. Gel 09 de julio

Reporting Tool version 12.3

Time of Report: 3:57 PM 9/27/2013 (Central America Standard Time)



Analysis Report: uvp015376_converted.tif



Lane Table

Lane	Bands	Band Volume	Lane Volume
Lane 1	17	1022429.38	1166105.40
Lane 2	3	300059.84	344655.29
Lane 3	3	281078.00	520042.92
Lane 4	3	354883.50	481678.88
Lane 5	3	204564.94	221721.90
Lane 6	3	2871453.00	3548818.00
Lane 7	3	176103.00	250944.54
Lane 8	4	87941.00	270632.59

Reporting Tool version 12.3
 Time of Report: 3:57 PM 9/27/2013 (Central America Standard Time)



Lane Data Report: uvp015376_converted.tif, Lane 1

Summary

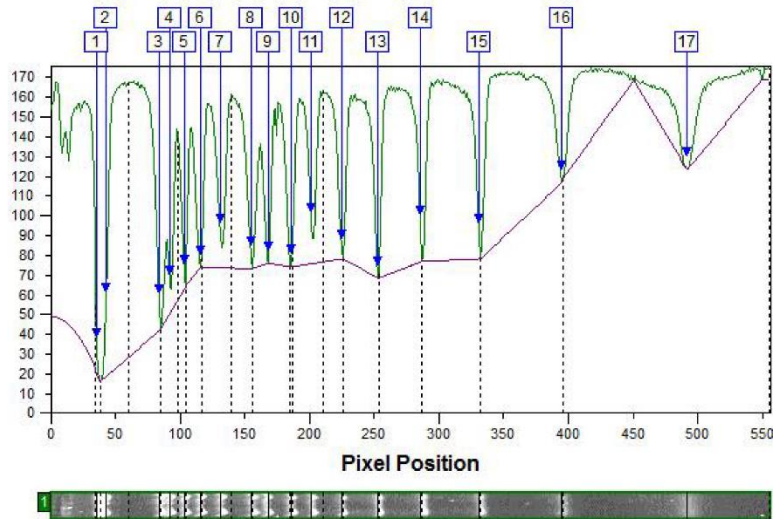
Name: Lane 1

Background

Background Type: Rolling Ball
 Rolling Ball Radius: 100

Band Detection

Automatic Detection: No
 Edge Detection Method: Automatic Edges
 Band Positions Edited: Yes



Band Table

Band No	Volume	Vol+BKGnd	Calib Vol(ug)	MW	Rf
1	1917.94	4828.00	-	3000.000	0.065
2	81248.67	98855.00	-	2000.000	0.077
3	108131.33	141508.00	-	1000.000	0.151
4	15656.11	40001.00	-	900.000	0.166
5	10659.89	24344.00	-	800.000	0.186
6	18054.00	52088.00	-	700.000	0.209
7	48125.30	112523.00	-	600.000	0.236
8	39263.20	83929.00	-	500.000	0.279
9	50422.00	133025.00	-	450.000	0.303
10	0.00	5644.00	-	400.000	0.335
11	53422.50	122298.00	-	350.000	0.362
12	36635.00	80801.00	-	300.000	0.405
13	69802.00	147866.00	-	250.000	0.456
14	97333.50	188496.00	-	200.000	0.515
15	127500.00	260202.00	-	150.000	0.596
16	153323.00	390507.00	-	100.000	0.712
17	110934.94	993055.00	-	50.000	0.886

Reporting Tool version 12.3
 Time of Report: 3:57 PM 9/27/2013 (Central America Standard Time)



Lane Data Report: uvp015376_converted.tif, Lane 2

Summary

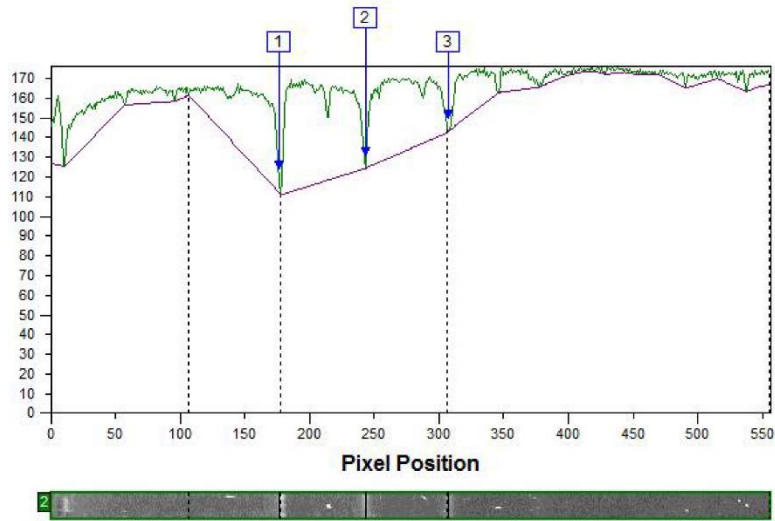
Name: Lane 2

Background

Background Type: Rolling Ball
 Rolling Ball Radius: 100

Band Detection

Automatic Detection: No
 Edge Detection Method: Automatic Edges
 Band Positions Edited: Yes



Band Table

Band No	Volume	Vol+BKGnd	Calib Vol(ug)	MW	Rf
1	65841.00	434333.00	-	424.359	0.319
2	180843.61	790211.00	-	267.793	0.438
3	53375.23	1624639.00	-	174.562	0.553

Reporting Tool version 12.3
 Time of Report: 3:57 PM 9/27/2013 (Central America Standard Time)



Lane Data Report: uvp015376_converted.tif, Lane 3

Summary

Name: Lane 3

Background

Background Type: Rolling Ball

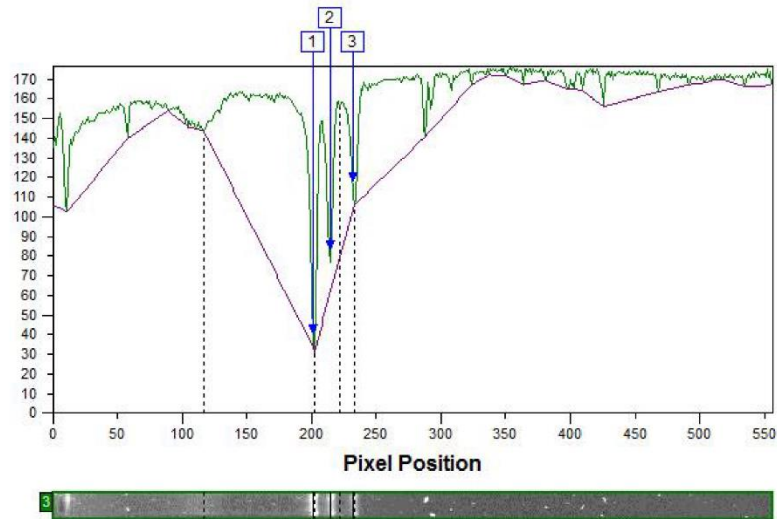
Rolling Ball Radius: 100

Band Detection

Automatic Detection: No

Edge Detection Method: Automatic Edges

Band Positions Edited: Yes



Band Table

Band No	Volume	Vol+BKGnd	Calib Vol(ug)	MW	Rf
1	209219.00	496774.00	-	350.000	0.362
2	48965.48	89930.00	-	317.297	0.387
3	22893.52	61132.00	-	287.726	0.418

Reporting Tool version 12.3
 Time of Report: 3:57 PM 9/27/2013 (Central America Standard Time)



Lane Data Report: uvp015376_converted.tif, Lane 4

Summary

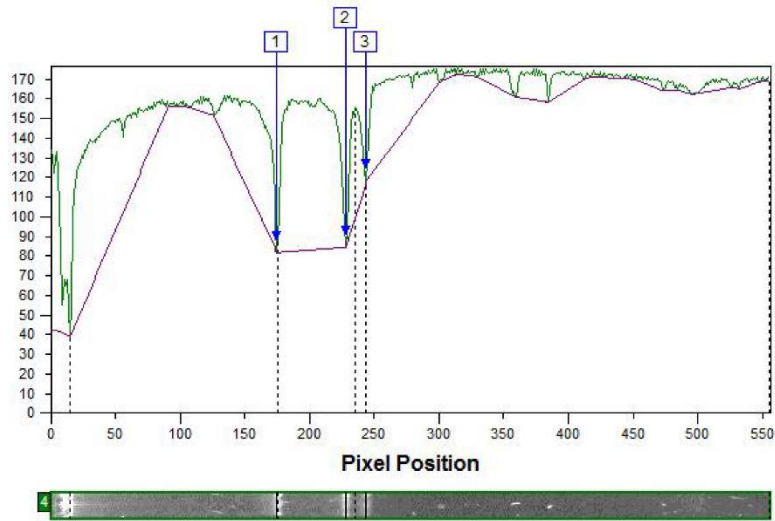
Name: Lane 4

Background

Background Type: Rolling Ball
 Rolling Ball Radius: 100

Band Detection

Automatic Detection: No
 Edge Detection Method: Automatic Edges
 Band Positions Edited: Yes



Band Table

Band No	Volume	Vol+BKGnd	Calib Vol(ug)	MW	Rf
1	202130.00	909466.00	-	429.559	0.315
2	141075.56	329664.00	-	294.810	0.411
3	11677.94	48484.00	-	267.793	0.438

Reporting Tool version 12.3
 Time of Report: 3:57 PM 9/27/2013 (Central America Standard Time)



Lane Data Report: uvp015376_converted.tif, Lane 5

Summary

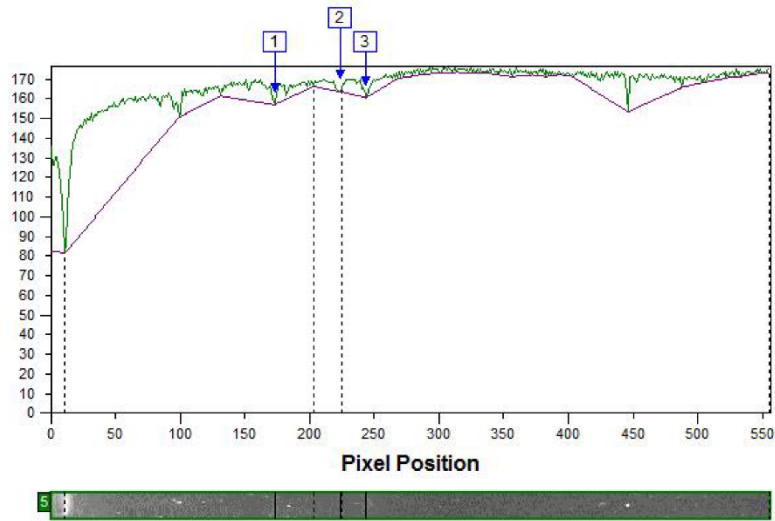
Name: Lane 5

Background

Background Type: Rolling Ball
 Rolling Ball Radius: 100

Band Detection

Automatic Detection: No
 Edge Detection Method: Automatic Edges
 Band Positions Edited: Yes



Band Table

Band No	Volume	Vol+BKGnd	Calib Vol(ug)	MW	Rf
1	148937.00	1163939.00	-	434.943	0.312
2	2380.00	140335.00	-	301.702	0.404
3	53247.94	2158779.00	-	265.981	0.440

Reporting Tool version 12.3
 Time of Report: 3:57 PM 9/27/2013 (Central America Standard Time)



Lane Data Report: uvp015376_converted.tif, Lane 6

Summary

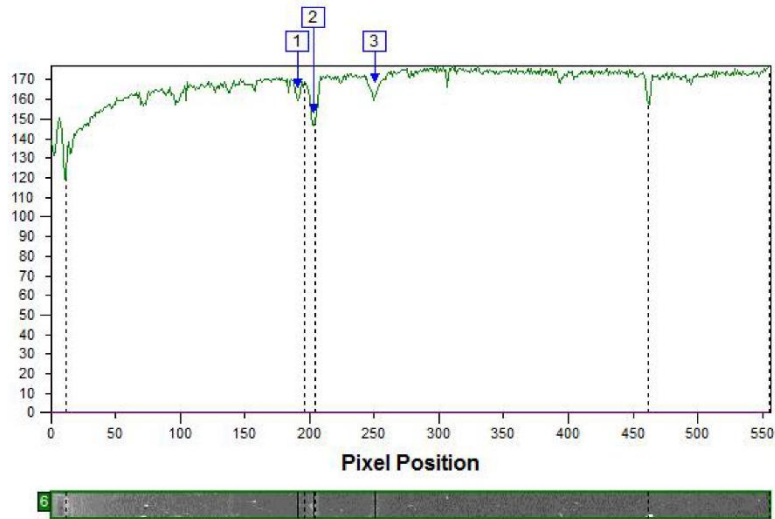
Name: Lane 6

Background

Background Type: None Calculated

Band Detection

Automatic Detection: No
 Edge Detection Method: Automatic Edges
 Band Positions Edited: Yes



Band Table

Band No	Volume	Vol+BKGnd	Calib Vol(ug)	MW	Rf
1	1130653.00	1130653.00	-	383.624	0.344
2	48450.00	48450.00	-	344.212	0.366
3	1692350.00	1692350.00	-	253.481	0.452

Reporting Tool version 12.3
 Time of Report: 3:57 PM 9/27/2013 (Central America Standard Time)



Lane Data Report: uvp015376_converted.tif, Lane 7

Summary

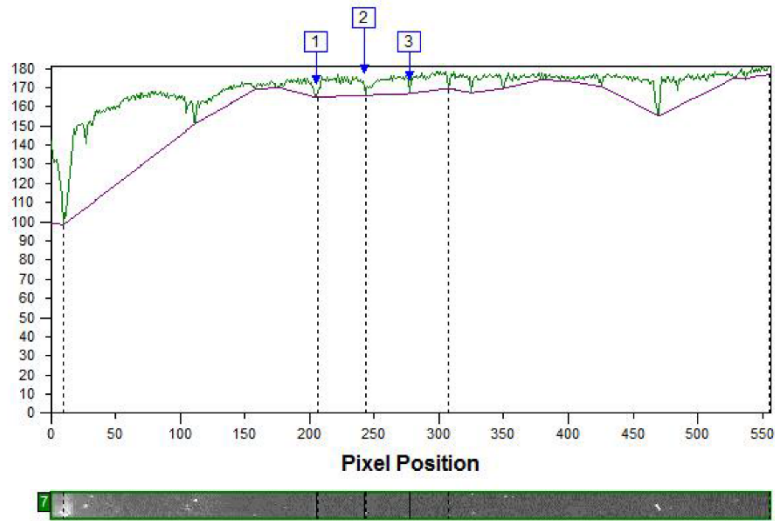
Name: Lane 7

Background

Background Type: Rolling Ball
 Rolling Ball Radius: 100

Band Detection

Automatic Detection: No
 Edge Detection Method: Automatic Edges
 Band Positions Edited: Yes



Band Table

Band No	Volume	Vol+BKGnd	Calib Vol(ug)	MW	Rf
1	146574.00	1215942.00	-	338.874	0.369
2	11339.00	244069.00	-	269.608	0.435
3	18190.00	424898.00	-	212.321	0.499

Reporting Tool version 12.3
 Time of Report: 3:57 PM 9/27/2013 (Central America Standard Time)



Lane Data Report: uvp015376_converted.tif, Lane 8

Summary

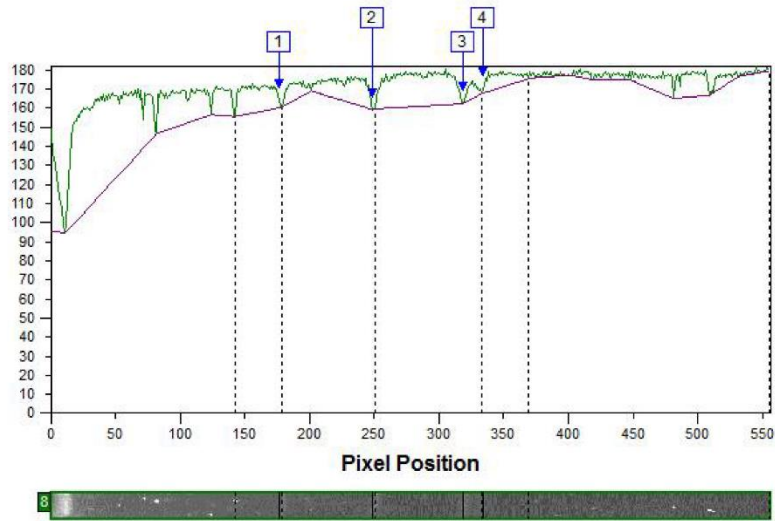
Name: Lane 8

Background

Background Type: Rolling Ball
 Rolling Ball Radius: 100

Band Detection

Automatic Detection: No
 Edge Detection Method: Automatic Edges
 Band Positions Edited: Yes



Band Table

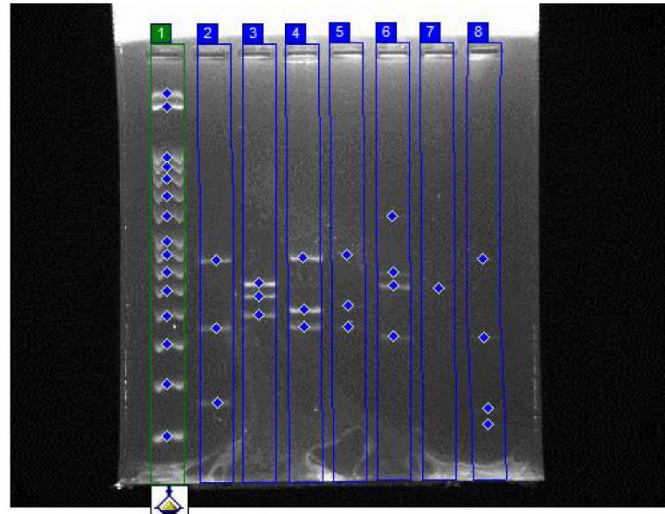
Band No	Volume	Vol+BKGnd	Calib Vol(ug)	MW	Rf
1	16056.50	232305.00	-	424.359	0.319
2	22848.00	472277.00	-	257.009	0.449
3	41344.00	545173.00	-	161.765	0.575
4	7692.50	242250.00	-	147.195	0.602

2. Gel 18 de julio

Reporting Tool version 12.3
Time of Report: 4:15 PM 9/27/2013 (Central America Standard Time)



Analysis Report: uvp015434.jpg



Lane Table

Lane	Bands	Band Volume	Lane Volume
Lane 1	15	785964.11	856568.35
Lane 2	3	381256.83	423904.80
Lane 3	3	247103.50	395248.75
Lane 4	3	302039.00	513615.32
Lane 5	3	99863.58	194391.93
Lane 6	4	159596.00	210052.78
Lane 7	1	2618.00	169244.54
Lane 8	4	202121.50	240383.83

Reporting Tool version 12.3
 Time of Report: 4:15 PM 9/27/2013 (Central America Standard Time)



Lane Data Report: uvp015434.jpg, Lane 1

Summary

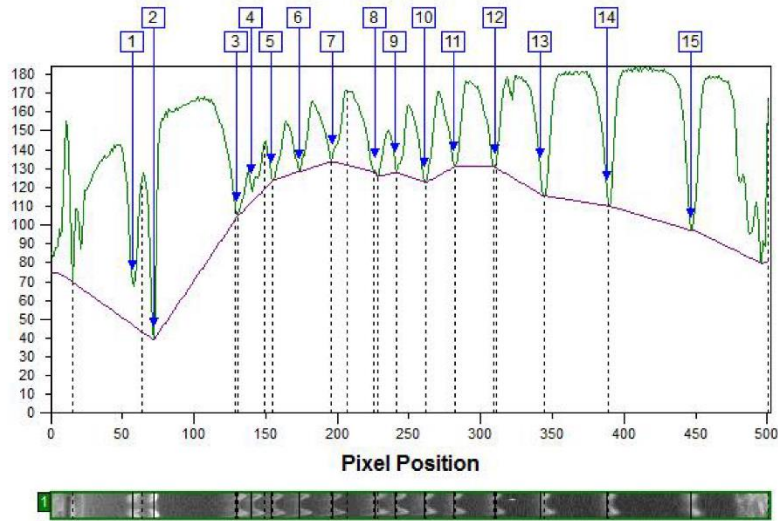
Name: Lane 1

Background

Background Type: Rolling Ball
 Rolling Ball Radius: 100

Band Detection

Automatic Detection: No
 Edge Detection Method: Automatic Edges
 Band Positions Edited: Yes



Band Table

Band No	Volume	Vol+BKGnd	Calib Vol(ug)	MW	Rf
1	112209.84	217957.00	-	3000.000	0.114
2	194954.23	359890.00	-	2000.000	0.144
3	348.93	8211.00	-	1000.000	0.259
4	7473.63	83827.00	-	900.000	0.279
5	3805.88	31348.00	-	800.000	0.307
6	26129.00	228593.00	-	700.000	0.345
7	7305.90	62832.00	-	600.000	0.393
8	102.00	14637.00	-	500.000	0.451
9	6426.00	69037.00	-	450.000	0.479
10	14739.00	114801.00	-	400.000	0.521
11	18045.50	114274.00	-	350.000	0.561
12	34.00	9979.00	-	300.000	0.619
13	51340.00	205615.00	-	250.000	0.683
14	91702.53	284784.00	-	200.000	0.774
15	251347.68	660892.00	-	150.000	0.892

Reporting Tool version 12.3
 Time of Report: 4:15 PM 9/27/2013 (Central America Standard Time)



Lane Data Report: uvp015434.jpg, Lane 2

Summary

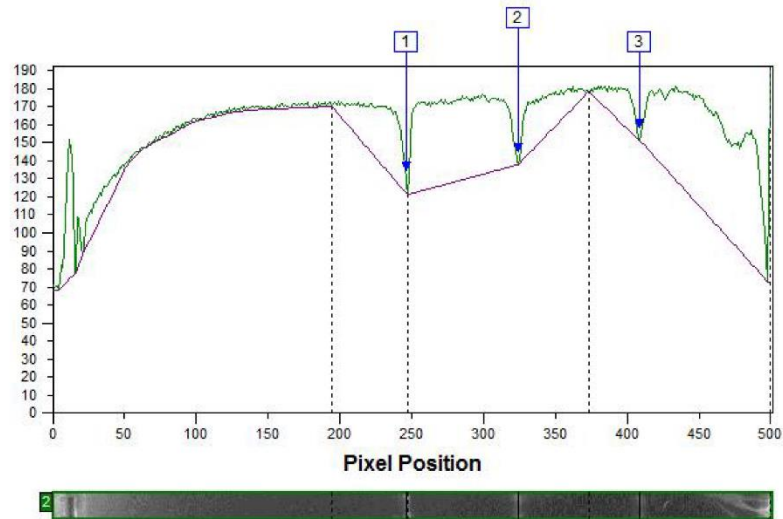
Name: Lane 2

Background

Background Type: Rolling Ball
 Rolling Ball Radius: 100

Band Detection

Automatic Detection: No
 Edge Detection Method: Automatic Edges
 Band Positions Edited: Yes



Band Table

Band No	Volume	Vol+BKGnd	Calib Vol(ug)	MW	Rf
1	43299.00	337960.00	-	433.042	0.492
2	149328.00	821253.00	-	276.068	0.648
3	188629.83	800394.00	-	180.809	0.818

Reporting Tool version 12.3
 Time of Report: 4:15 PM 9/27/2013 (Central America Standard Time)



Lane Data Report: uvp015434.jpg, Lane 3

Summary

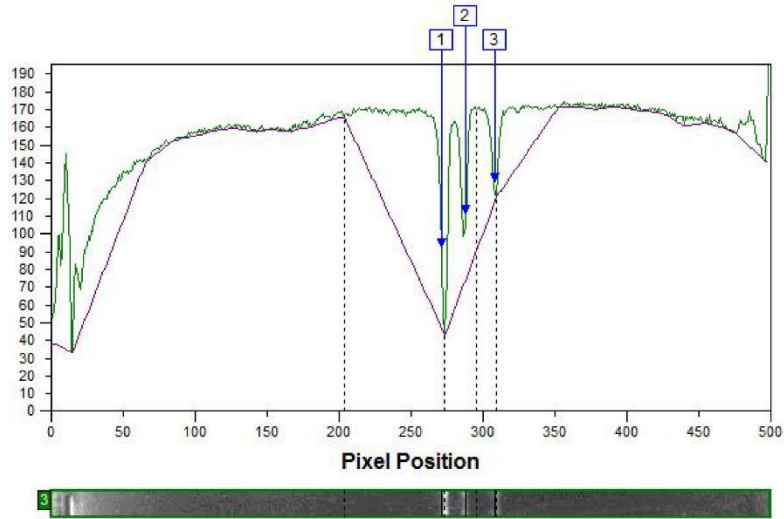
Name: Lane 3

Background

Background Type: Rolling Ball
 Rolling Ball Radius: 100

Band Detection

Automatic Detection: No
 Edge Detection Method: Automatic Edges
 Band Positions Edited: Yes



Band Table

Band No	Volume	Vol+BKGnd	Calib Vol(ug)	MW	Rf
1	156060.00	436849.00	-	369.667	0.545
2	62354.58	117504.00	-	333.611	0.577
3	28688.92	84371.00	-	300.000	0.619

Reporting Tool version 12.3
 Time of Report: 4:15 PM 9/27/2013 (Central America Standard Time)



Lane Data Report: uvp015434.jpg, Lane 4

Summary

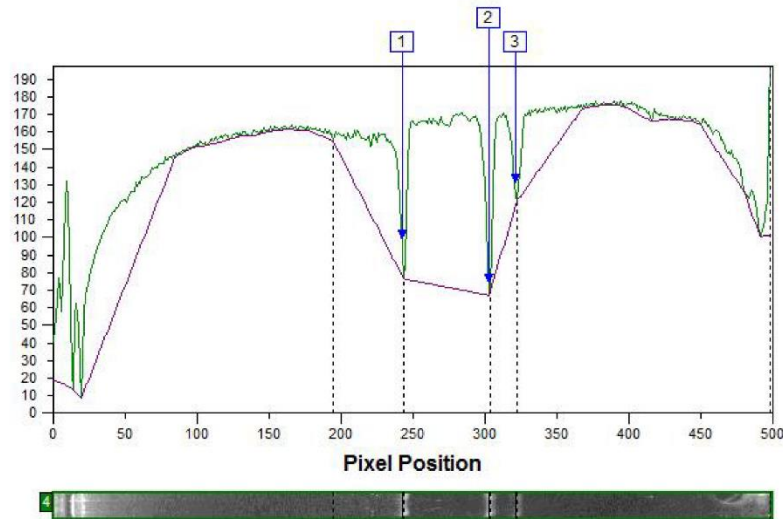
Name: Lane 4

Background

Background Type: Rolling Ball
 Rolling Ball Radius: 100

Band Detection

Automatic Detection: No
 Edge Detection Method: Automatic Edges
 Band Positions Edited: Yes



Band Table

Band No	Volume	Vol+BKGnd	Calib Vol(ug)	MW	Rf
1	67898.00	284718.00	-	438.623	0.487
2	194769.00	358479.00	-	309.089	0.607
3	39372.00	107202.00	-	279.367	0.645

Reporting Tool version 12.3
 Time of Report: 4:15 PM 9/27/2013 (Central America Standard Time)



Lane Data Report: uvp015434.jpg, Lane 5

Summary

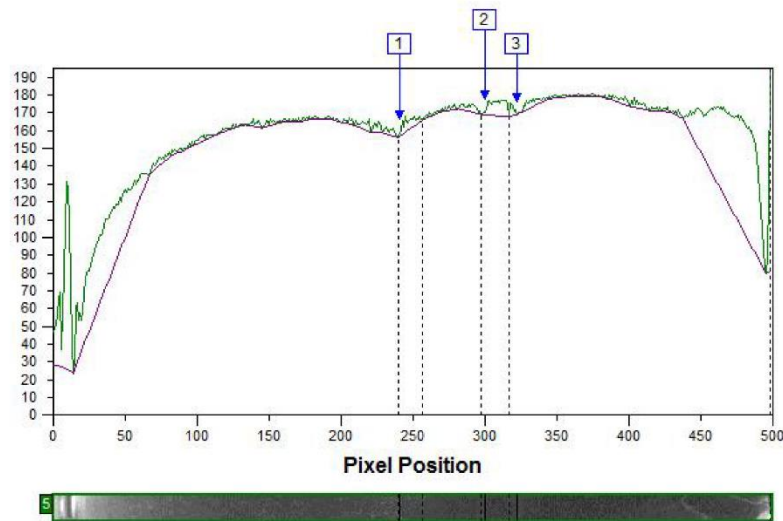
Name: Lane 5

Background

Background Type: Rolling Ball
 Rolling Ball Radius: 100

Band Detection

Automatic Detection: No
 Edge Detection Method: Automatic Edges
 Band Positions Edited: Yes



Band Table

Band No	Volume	Vol+BKGnd	Calib Vol(ug)	MW	Rf
1	2601.00	106454.00	-	444.091	0.483
2	4658.00	126293.00	-	313.661	0.601
3	92604.58	1178389.00	-	277.758	0.647

Reporting Tool version 12.3
 Time of Report: 4:15 PM 9/27/2013 (Central America Standard Time)



Lane Data Report: uvp015434.jpg, Lane 6

Summary

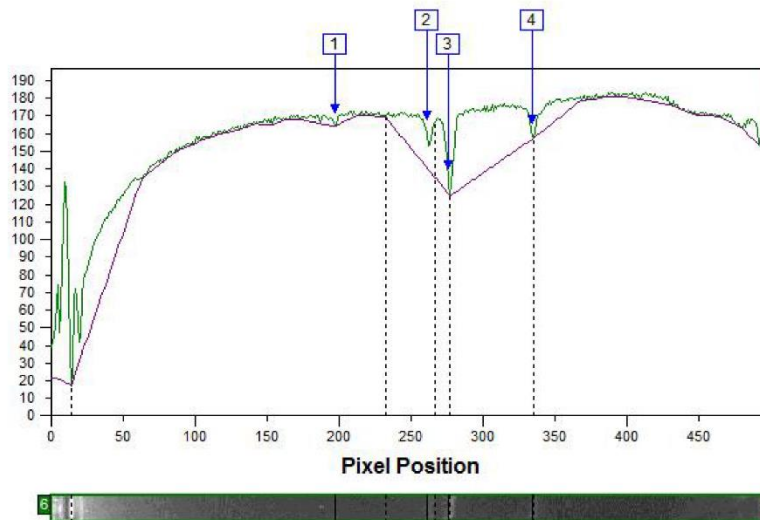
Name: Lane 6

Background

Background Type: Rolling Ball
 Rolling Ball Radius: 100

Band Detection

Automatic Detection: No
 Edge Detection Method: Automatic Edges
 Band Positions Edited: Yes



Band Table

Band No	Volume	Vol+BKGnd	Calib Vol(ug)	MW	Rf
1	62483.50	1233163.00	-	596.385	0.396
2	20199.78	223227.00	-	395.106	0.524
3	10995.22	60503.00	-	356.988	0.554
4	65917.50	376380.00	-	258.786	0.671

Reporting Tool version 12.3
 Time of Report: 4:15 PM 9/27/2013 (Central America Standard Time)



Lane Data Report: uvp015434.jpg, Lane 7

Summary

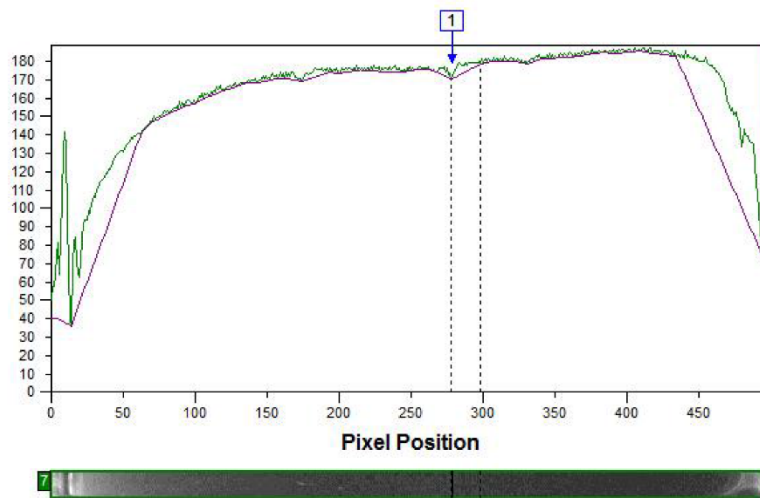
Name: Lane 7

Background

Background Type: Rolling Ball
 Rolling Ball Radius: 100

Band Detection

Automatic Detection: No
 Edge Detection Method: Automatic Edges
 Band Positions Edited: Yes



Band Table

Band No	Volume	Vol+BKGnd	Calib Vol(ug)	MW	Rf
1	2618.00	135065.00	-	350.000	0.560

Reporting Tool version 12.3
 Time of Report: 4:15 PM 9/27/2013 (Central America Standard Time)



Lane Data Report: uvp015434.jpg, Lane 8

Summary

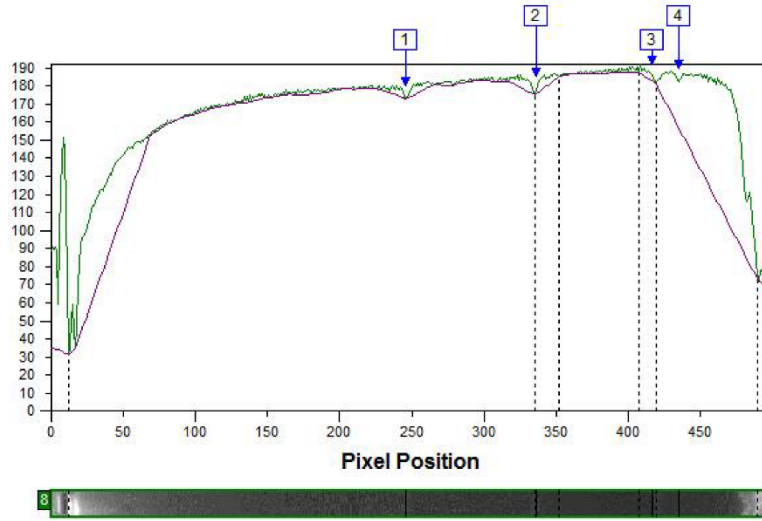
Name: Lane 8

Background

Background Type: Rolling Ball
 Rolling Ball Radius: 100

Band Detection

Automatic Detection: No
 Edge Detection Method: Automatic Edges
 Band Positions Edited: Yes



Band Table

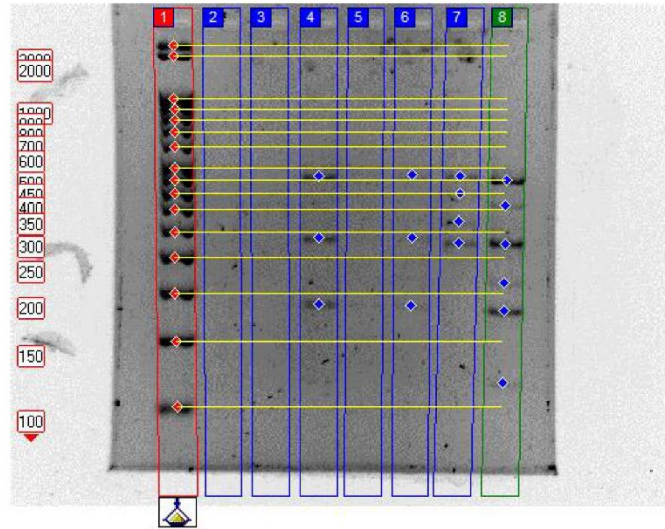
Band No	Volume	Vol+BKGnd	Calib Vol(ug)	MW	Rf
1	82356.50	2033149.00	-	428.704	0.495
2	2584.00	118711.00	-	254.462	0.675
3	1343.00	85510.00	-	173.003	0.837
4	115838.00	457028.00	-	156.795	0.875

3. Gel 1, 5 de agosto

Reporting Tool version 12.3
Time of Report: 3:53 PM 9/27/2013 (Central America Standard Time)



Analysis Report: uvp015517.jpg



Lane Table

Lane	Bands	Band Volume	Lane Volume
Lane 1	16	473142.03	576465.62
Lane 2	0	0.00	151612.17
Lane 3	0	0.00	139687.56
Lane 4	3	29079.81	174017.70
Lane 5	0	0.00	152958.58
Lane 6	3	8596.37	160001.88
Lane 7	4	25923.65	165032.69
Lane 8	6	85415.45	209670.67

Reporting Tool version 12.3
 Time of Report: 3:53 PM 9/27/2013 (Central America Standard Time)



Lane Data Report: uvp015517.jpg, Lane 1

Summary

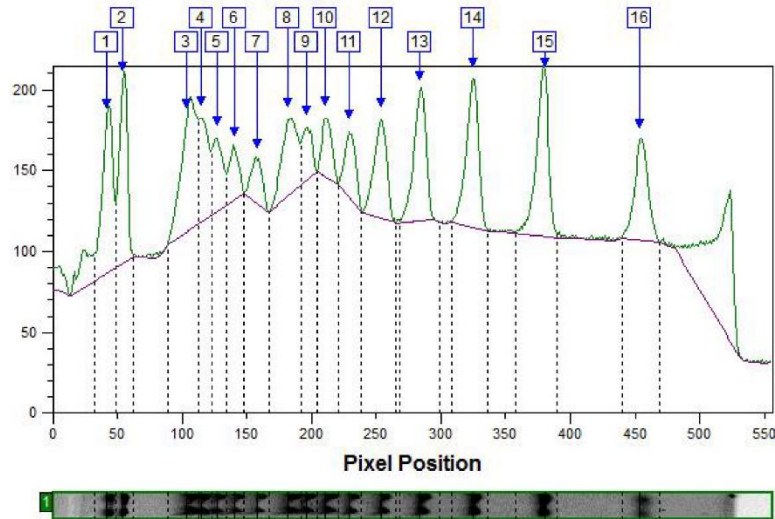
Name: Lane 1

Background

Background Type: Rolling Ball
 Rolling Ball Radius: 100

Band Detection

Automatic Detection: No
 Edge Detection Method: Automatic Edges
 Band Positions Edited: Yes



Band Table

Band No	Volume	Vol+BKGnd	Calib Vol(ug)	MW	Rf
1	42807.42	106845.00	-	3000.000	0.076
2	37953.21	91205.00	-	2000.000	0.097
3	49187.92	165869.00	-	1000.000	0.186
4	24699.27	77333.00	-	900.000	0.207
5	18117.97	78744.00	-	800.000	0.229
6	14329.85	95625.00	-	700.000	0.254
7	12155.00	121006.00	-	600.000	0.285
8	28888.67	174488.00	-	500.000	0.328
9	12606.33	89199.00	-	450.000	0.353
10	15113.00	124100.00	-	400.000	0.380
11	17153.00	117079.00	-	350.000	0.413
12	30081.50	174216.00	-	300.000	0.458
13	40253.80	202232.00	-	250.000	0.512
14	44089.79	186422.00	-	200.000	0.586
15	51244.31	205989.00	-	150.000	0.685
16	34459.00	171020.00	-	100.000	0.818

Reporting Tool version 12.3
 Time of Report: 3:53 PM 9/27/2013 (Central America Standard Time)



Lane Data Report: uvp015517.jpg, Lane 2

Summary

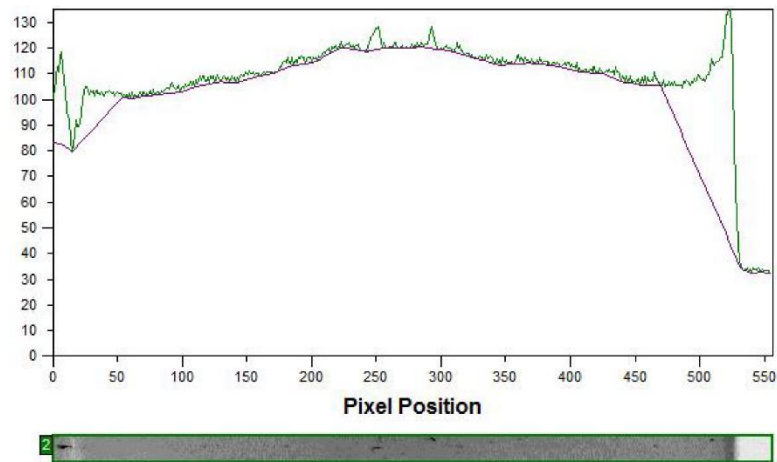
Name: Lane 2

Background

Background Type: Rolling Ball
 Rolling Ball Radius: 100

Band Detection

Automatic Detection: No
 Edge Detection Method: Automatic Edges
 Band Positions Edited: No



Band Table

Reporting Tool version 12.3
 Time of Report: 3:53 PM 9/27/2013 (Central America Standard Time)



Lane Data Report: uvp015517.jpg, Lane 3

Summary

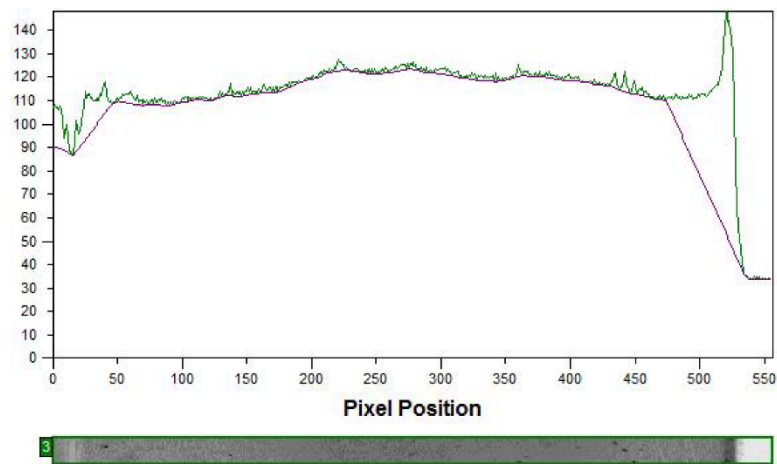
Name:	Lane 3
--------------	--------

Background

Background Type:	Rolling Ball
Rolling Ball Radius:	100

Band Detection

Automatic Detection:	No
Edge Detection Method:	Automatic Edges
Band Positions Edited:	No



Band Table

Reporting Tool version 12.3
 Time of Report: 3:53 PM 9/27/2013 (Central America Standard Time)



Lane Data Report: uvp015517.jpg, Lane 4

Summary

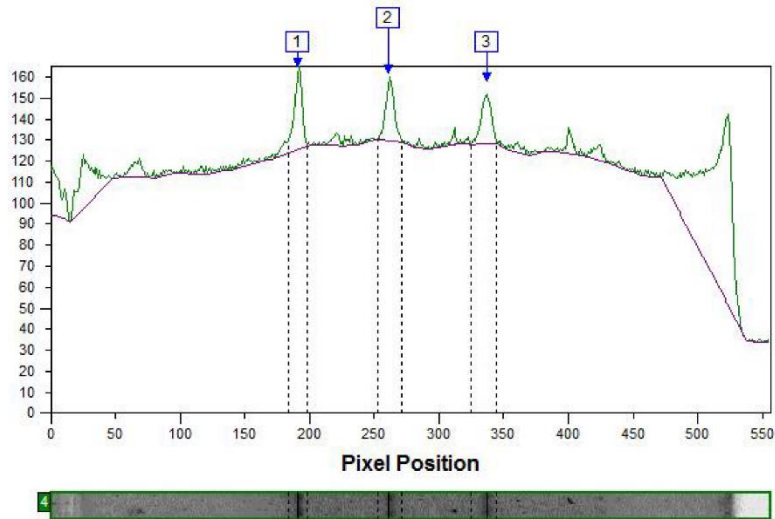
Name: Lane 4

Background

Background Type: Rolling Ball
 Rolling Ball Radius: 100

Band Detection

Automatic Detection: No
 Edge Detection Method: Automatic Edges
 Band Positions Edited: Yes



Band Table

Band No	Volume	Vol+BKGnd	Calib Vol(ug)	MW	Rf
1	11093.81	84796.00	-	467.586	0.344
2	9248.00	107321.00	-	287.628	0.470
3	8738.00	110959.00	-	187.888	0.607

Reporting Tool version 12.3
 Time of Report: 3:53 PM 9/27/2013 (Central America Standard Time)



Lane Data Report: uvp015517.jpg, Lane 5

Summary

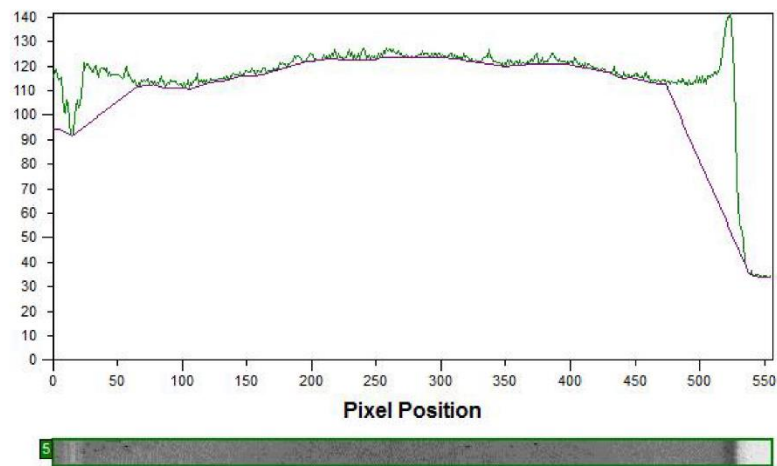
Name:	Lane 5
--------------	--------

Background

Background Type:	Rolling Ball
Rolling Ball Radius:	100

Band Detection

Automatic Detection:	No
Edge Detection Method:	Automatic Edges
Band Positions Edited:	No



Band Table

Reporting Tool version 12.3
 Time of Report: 3:53 PM 9/27/2013 (Central America Standard Time)



Lane Data Report: uvp015517.jpg, Lane 6

Summary

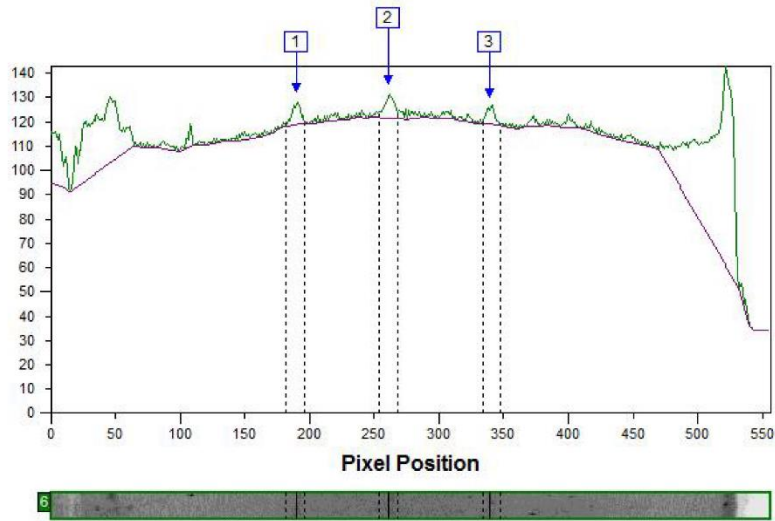
Name: Lane 6

Background

Background Type: Rolling Ball
 Rolling Ball Radius: 100

Band Detection

Automatic Detection: No
 Edge Detection Method: Automatic Edges
 Band Positions Edited: Yes



Band Table

Band No	Volume	Vol+BKGnd	Calib Vol(ug)	MW	Rf
1	2902.00	72692.00	-	471.141	0.342
2	3450.37	74868.00	-	287.628	0.470
3	2244.00	67218.00	-	185.936	0.611

Reporting Tool version 12.3
 Time of Report: 3:53 PM 9/27/2013 (Central America Standard Time)



Lane Data Report: uvp015517.jpg, Lane 7

Summary

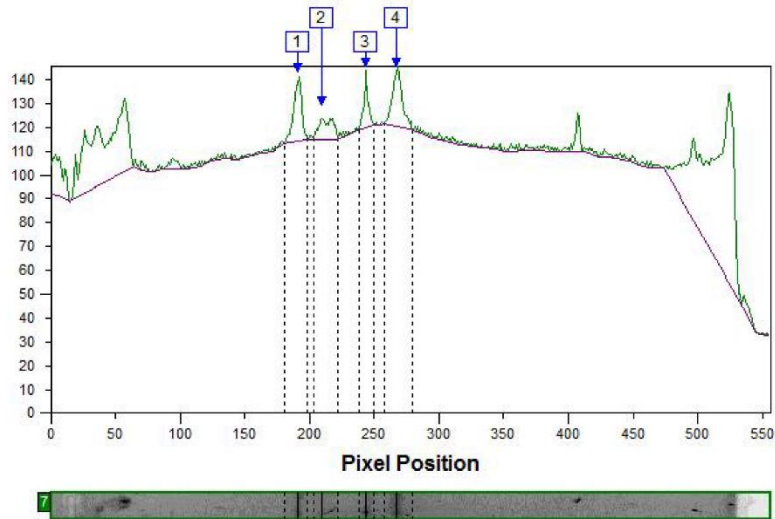
Name: Lane 7

Background

Background Type: Rolling Ball
 Rolling Ball Radius: 100

Band Detection

Automatic Detection: No
 Edge Detection Method: Automatic Edges
 Band Positions Edited: Yes



Band Table

Band No	Volume	Vol+BKGnd	Calib Vol(ug)	MW	Rf
1	7748.22	89182.00	-	467.586	0.344
2	5015.00	96747.00	-	403.143	0.378
3	4371.43	64821.00	-	320.174	0.438
4	8789.00	119918.00	-	277.264	0.481

Reporting Tool version 12.3
 Time of Report: 3:53 PM 9/27/2013 (Central America Standard Time)



Lane Data Report: uvp015517.jpg, Lane 8

Summary

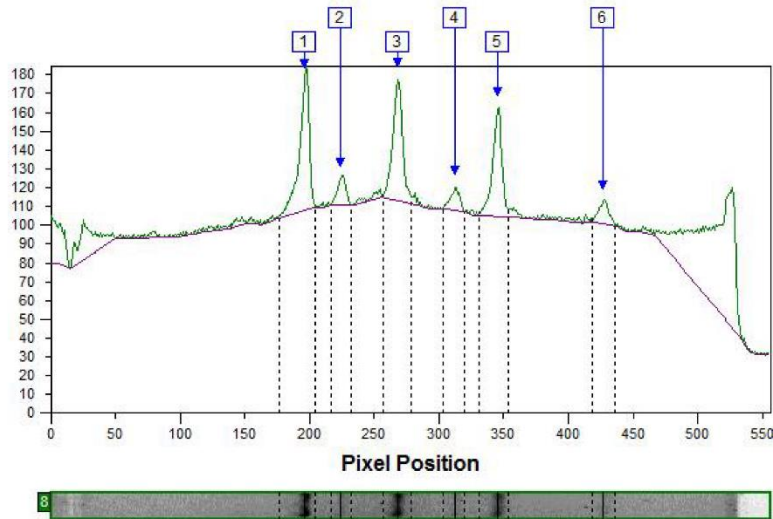
Name: Lane 8

Background

Background Type: Rolling Ball
 Rolling Ball Radius: 100

Band Detection

Automatic Detection: No
 Edge Detection Method: Automatic Edges
 Band Positions Edited: Yes



Band Table

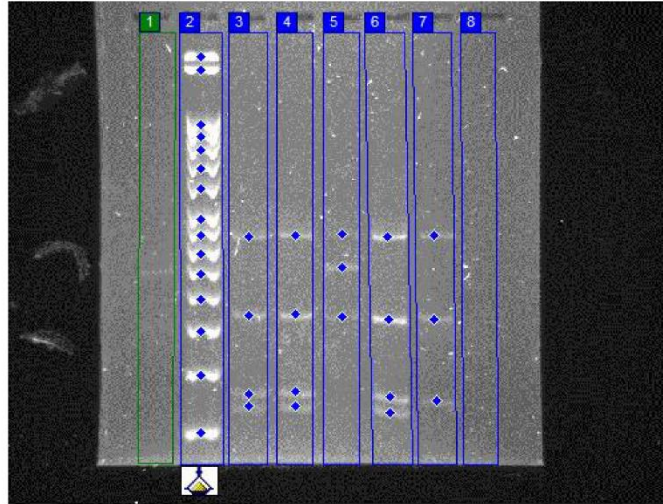
Band No	Volume	Vol+BKGnd	Calib Vol(ug)	MW	Rf
1	26630.50	147577.00	-	450.000	0.353
2	4981.00	74596.00	-	362.546	0.404
3	23204.41	127789.00	-	275.566	0.483
4	4437.00	81634.00	-	212.892	0.564
5	21550.17	122808.00	-	180.194	0.622
6	4612.37	76619.00	-	116.975	0.769

4. Gel 2, 5 de agosto

Reporting Tool version 12.3
Time of Report: 3:34 PM 9/27/2013 (Central America Standard Time)



Analysis Report: uvp015519.jpg



Lane Table

Lane	Bands	Band Volume	Lane Volume
Lane 1	0	0.00	41925.78
Lane 2	15	391143.08	418617.56
Lane 3	4	21511.58	99864.22
Lane 4	4	35327.33	116498.74
Lane 5	3	13573.25	92649.40
Lane 6	4	53371.26	125054.82
Lane 7	3	15050.63	74161.11
Lane 8	0	0.00	46776.76

Reporting Tool version 12.3
Time of Report: 3:34 PM 9/27/2013 (Central America Standard Time)



Lane Data Report: uvp015519.jpg, Lane 1

Summary

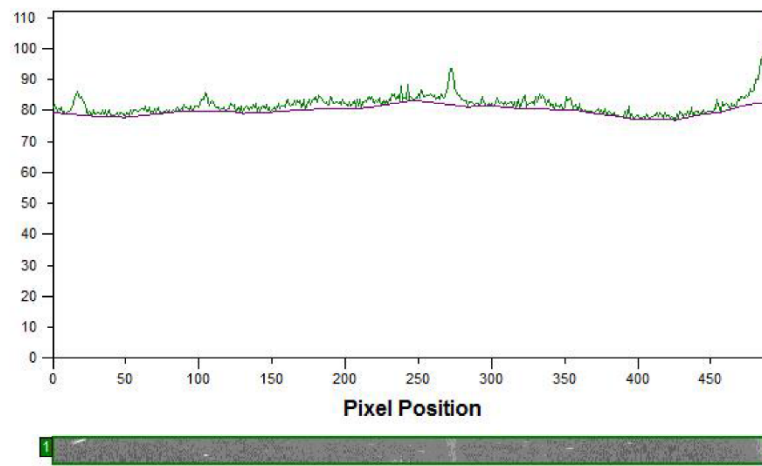
Name: Lane 1

Background

Background Type: Rolling Ball
Rolling Ball Radius: 100

Band Detection

Automatic Detection: No
Edge Detection Method: Automatic Edges
Band Positions Edited: No



Reporting Tool version 12.3
 Time of Report: 3:34 PM 9/27/2013 (Central America Standard Time)



Lane Data Report: uvp015519.jpg, Lane 2

Summary

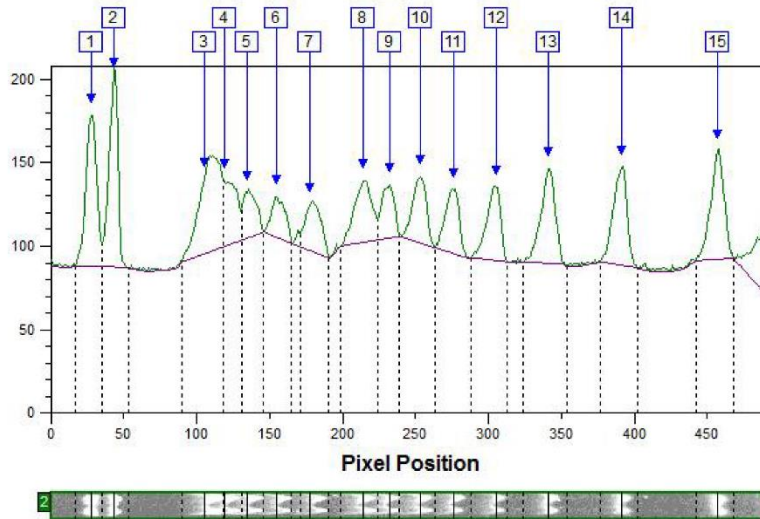
Name: Lane 2

Background

Background Type: Rolling Ball
 Rolling Ball Radius: 100

Band Detection

Automatic Detection: No
 Edge Detection Method: Automatic Edges
 Band Positions Edited: Yes



Band Table

Band No	Volume	Vol+BKGnd	Calib Vol(ug)	MW	Rf
1	38143.63	114189.00	-	3000.000	0.057
2	40022.37	115753.00	-	2000.000	0.087
3	44531.50	172125.00	-	1000.000	0.213
4	20763.07	84048.00	-	900.000	0.242
5	14775.43	90984.00	-	800.000	0.274
6	13124.00	109055.00	-	700.000	0.315
7	18290.58	106335.00	-	600.000	0.362
8	24684.00	146999.00	-	500.000	0.435
9	15980.00	91409.00	-	450.000	0.472
10	21156.50	139434.00	-	400.000	0.514
11	20893.00	135966.00	-	350.000	0.561
12	23358.00	133705.00	-	300.000	0.620
13	31365.00	160786.00	-	250.000	0.693
14	30872.00	137632.00	-	200.000	0.795
15	33184.00	148070.00	-	150.000	0.929

Reporting Tool version 12.3
 Time of Report: 3:34 PM 9/27/2013 (Central America Standard Time)



Lane Data Report: uvp015519.jpg, Lane 3

Summary

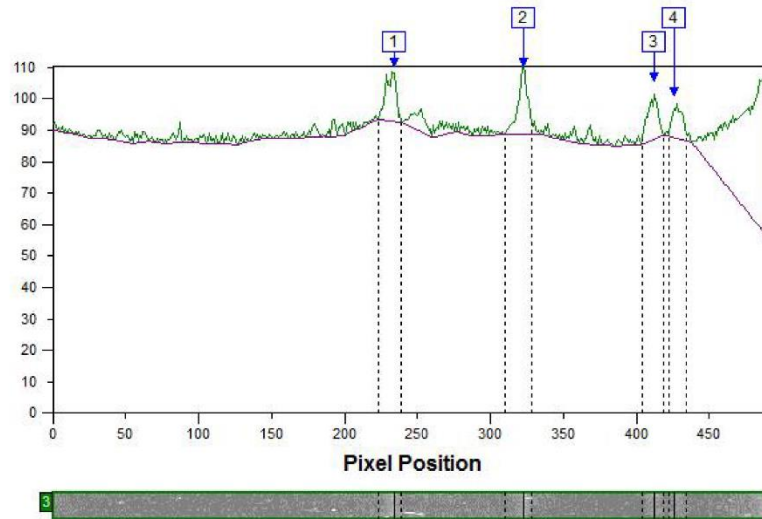
Name: Lane 3

Background

Background Type: Rolling Ball
 Rolling Ball Radius: 100

Band Detection

Automatic Detection: No
 Edge Detection Method: Automatic Edges
 Band Positions Edited: Yes



Band Table

Band No	Volume	Vol+BKGnd	Calib Vol(ug)	MW	Rf
1	5732.00	71196.00	-	444.775	0.476
2	6885.00	77265.00	-	273.545	0.657
3	5185.00	62560.00	-	183.056	0.837
4	3709.58	49878.00	-	172.447	0.866

Reporting Tool version 12.3
 Time of Report: 3:34 PM 9/27/2013 (Central America Standard Time)



Lane Data Report: uvp015519.jpg, Lane 4

Summary

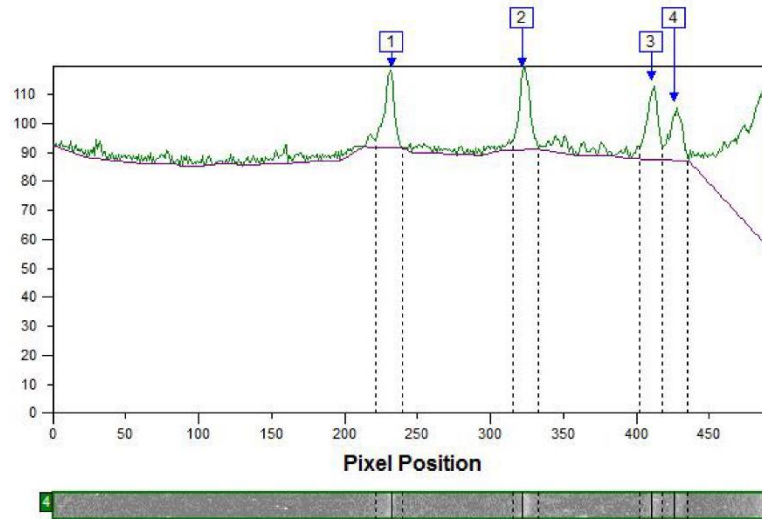
Name: Lane 4

Background

Background Type: Rolling Ball
 Rolling Ball Radius: 100

Band Detection

Automatic Detection: No
 Edge Detection Method: Automatic Edges
 Band Positions Edited: Yes



Band Table

Band No	Volume	Vol+BKGnd	Calib Vol(ug)	MW	Rf
1	8686.37	81804.00	-	450.000	0.472
2	10056.81	78795.00	-	274.944	0.654
3	9235.36	68085.00	-	184.611	0.833
4	7348.79	69632.00	-	172.447	0.866

Reporting Tool version 12.3
 Time of Report: 3:34 PM 9/27/2013 (Central America Standard Time)



Lane Data Report: uvp015519.jpg, Lane 5

Summary

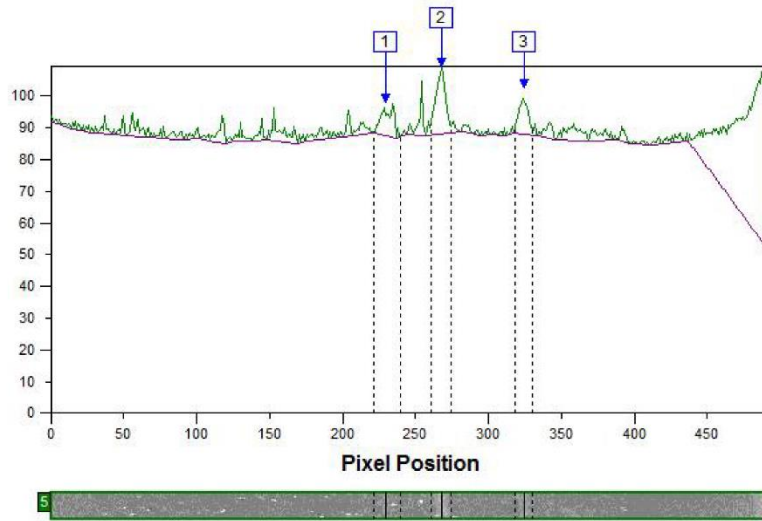
Name: Lane 5

Background

Background Type: Rolling Ball
 Rolling Ball Radius: 100

Band Detection

Automatic Detection: No
 Edge Detection Method: Automatic Edges
 Band Positions Edited: Yes



Band Table

Band No	Volume	Vol+BKGnd	Calib Vol(ug)	MW	Rf
1	3782.50	70312.00	-	455.374	0.467
2	6506.75	52309.00	-	366.631	0.545
3	3284.00	45560.00	-	270.773	0.661

Reporting Tool version 12.3
 Time of Report: 3:34 PM 9/27/2013 (Central America Standard Time)



Lane Data Report: uvp015519.jpg, Lane 6

Summary

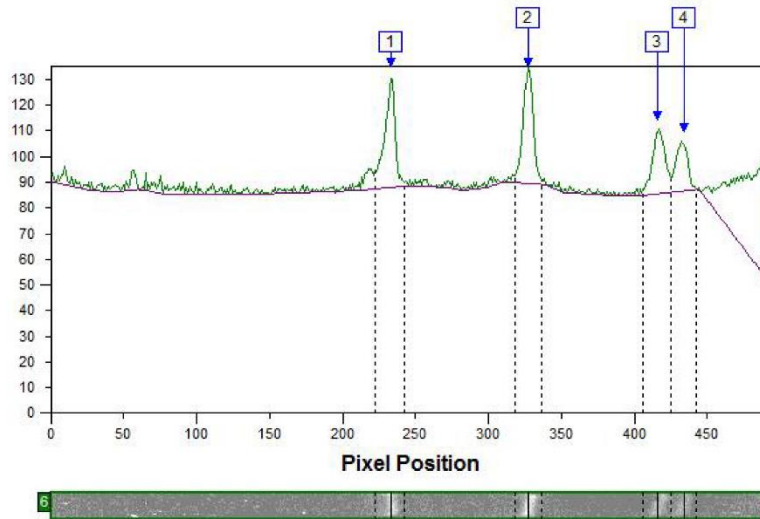
Name: Lane 6

Background

Background Type: Rolling Ball
 Rolling Ball Radius: 100

Band Detection

Automatic Detection: No
 Edge Detection Method: Automatic Edges
 Band Positions Edited: Yes



Band Table

Band No	Volume	Vol+BKGnd	Calib Vol(ug)	MW	Rf
1	16420.45	97325.00	-	447.369	0.474
2	16711.65	90899.00	-	268.038	0.665
3	11680.31	86343.00	-	179.979	0.846
4	8558.85	76296.00	-	166.556	0.882

Reporting Tool version 12.3
 Time of Report: 3:34 PM 9/27/2013 (Central America Standard Time)



Lane Data Report: uvp015519.jpg, Lane 7

Summary

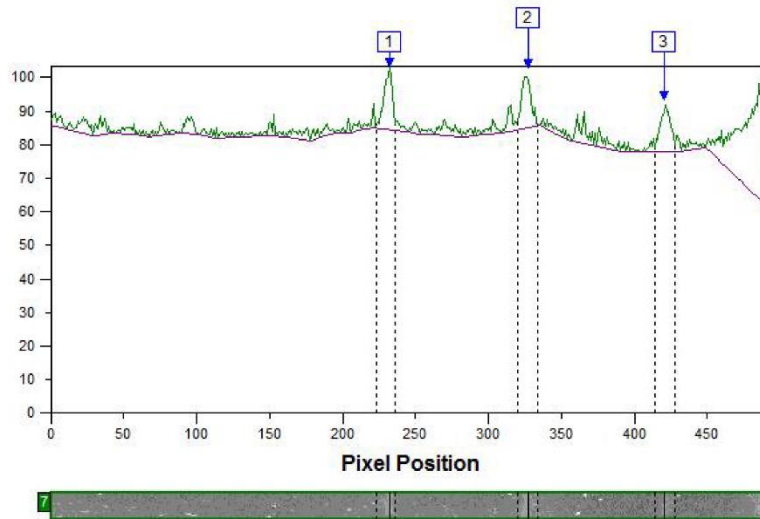
Name: Lane 7

Background

Background Type: Rolling Ball
 Rolling Ball Radius: 100

Band Detection

Automatic Detection: No
 Edge Detection Method: Automatic Edges
 Band Positions Edited: Yes



Band Table

Band No	Volume	Vol+BKGnd	Calib Vol(ug)	MW	Rf
1	5063.78	53482.00	-	450.000	0.472
2	5124.85	57494.00	-	268.038	0.665
3	4862.00	52938.00	-	176.940	0.854

Reporting Tool version 12.3
Time of Report: 3:34 PM 9/27/2013 (Central America Standard Time)



Lane Data Report: uvp015519.jpg, Lane 8

Summary

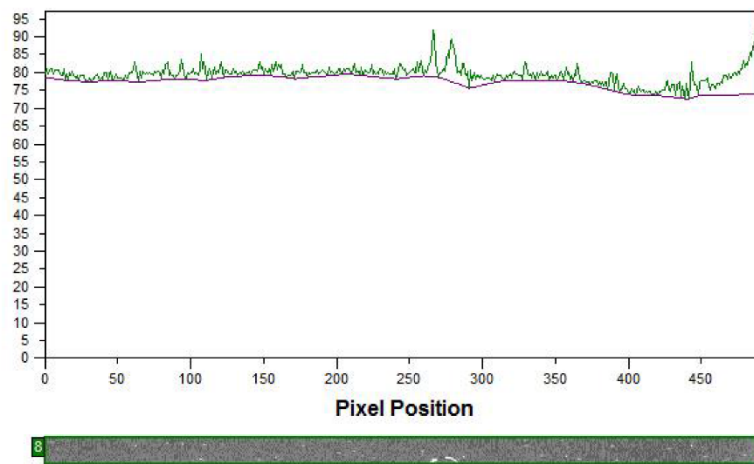
Name:	Lane 8
-------	--------

Background

Background Type:	Rolling Ball
Rolling Ball Radius:	100

Band Detection

Automatic Detection:	No
Edge Detection Method:	Automatic Edges
Band Positions Edited:	No



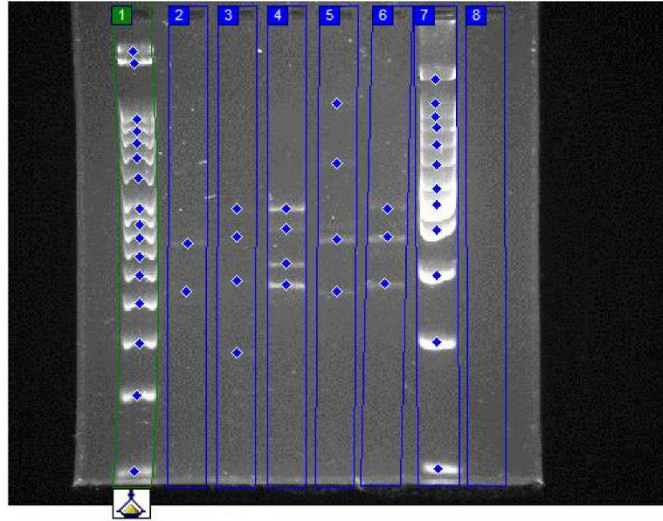
Band Table

5. Gel 13 de agosto

Reporting Tool version 12.3
Time of Report: 2:54 PM 9/27/2013 (Central America Standard Time)



Analysis Report: uvp015610.jpg



Lane Table

Lane	Bands	Band Volume	Lane Volume
Lane 1	16	642714.50	663137.62
Lane 2	2	6210.00	141699.67
Lane 3	4	9256.50	121639.21
Lane 4	4	64163.19	180812.40
Lane 5	4	20615.18	144854.71
Lane 6	3	33551.84	140376.79
Lane 7	12	2939096.00	3711355.00
Lane 8	0	0.00	89819.66

Reporting Tool version 12.3
 Time of Report: 2:54 PM 9/27/2013 (Central America Standard Time)



Lane Data Report: uvp015610.jpg, Lane 1

Summary

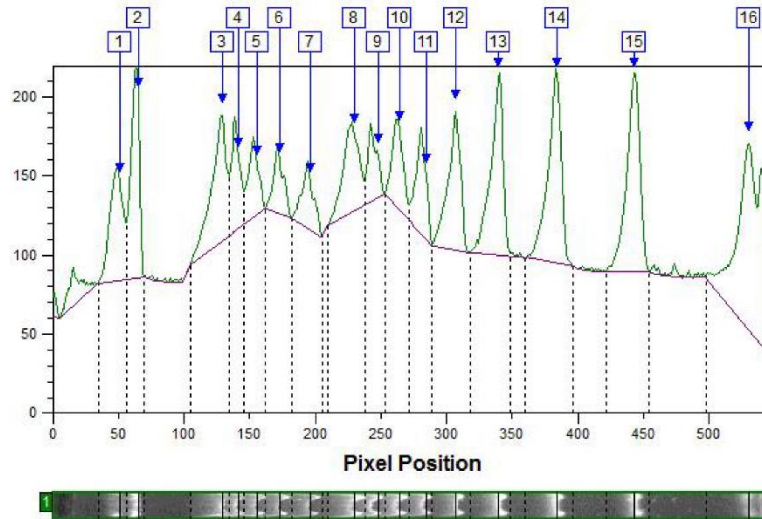
Name: Lane 1

Background

Background Type: Rolling Ball
 Rolling Ball Radius: 100

Band Detection

Automatic Detection: No
 Edge Detection Method: Automatic Edges
 Band Positions Edited: Yes



Band Table

Band No	Volume	Vol+BKGnd	Calib Vol(ug)	MW	Rf
1	35775.08	112659.00	-	3000.000	0.093
2	44677.42	97206.00	-	2000.000	0.119
3	44177.93	175117.00	-	1000.000	0.236
4	25513.42	86445.00	-	900.000	0.260
5	20000.65	107389.00	-	800.000	0.285
6	15725.00	127041.00	-	700.000	0.316
7	18266.50	136935.00	-	600.000	0.358
8	34187.00	188122.00	-	500.000	0.420
9	17195.50	106318.00	-	450.000	0.453
10	23579.00	127058.00	-	400.000	0.483
11	26656.00	117283.00	-	350.000	0.521
12	41616.00	173893.00	-	300.000	0.561
13	56282.50	193256.00	-	250.000	0.620
14	60443.50	212551.00	-	200.000	0.702
15	63478.00	189696.00	-	150.000	0.810
16	115141.00	246075.00	-	100.000	0.969

Reporting Tool version 12.3
 Time of Report: 2:54 PM 9/27/2013 (Central America Standard Time)



Lane Data Report: uvp015610.jpg, Lane 2

Summary

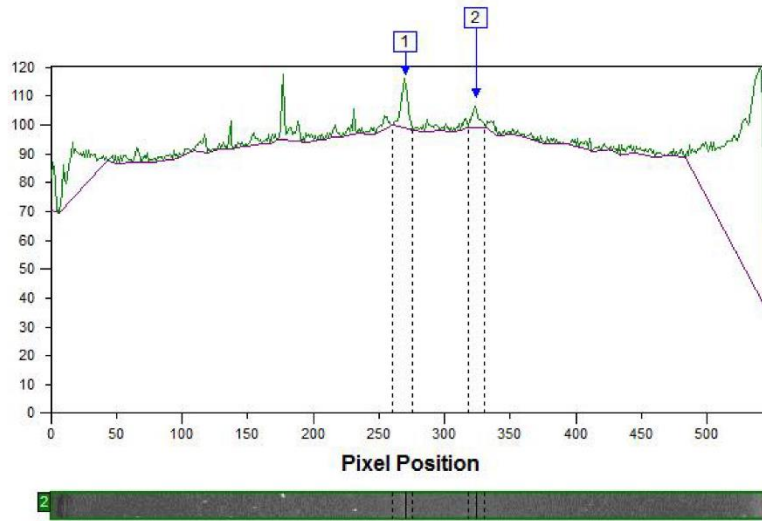
Name: Lane 2

Background

Background Type: Rolling Ball
 Rolling Ball Radius: 100

Band Detection

Automatic Detection: No
 Edge Detection Method: Automatic Edges
 Band Positions Edited: Yes



Band Table

Band No	Volume	Vol+BKGnd	Calib Vol(ug)	MW	Rf
1	4391.00	74239.00	-	384.156	0.494
2	1819.00	54247.00	-	270.343	0.592

Reporting Tool version 12.3
 Time of Report: 2:54 PM 9/27/2013 (Central America Standard Time)



Lane Data Report: uvp015610.jpg, Lane 3

Summary

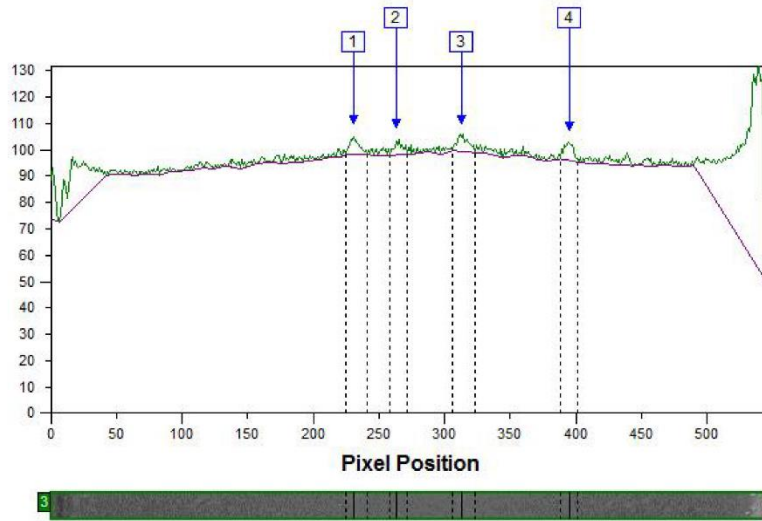
Name: Lane 3

Background

Background Type: Rolling Ball
 Rolling Ball Radius: 100

Band Detection

Automatic Detection: No
 Edge Detection Method: Automatic Edges
 Band Positions Edited: Yes



Band Table

Band No	Volume	Vol+BKGnd	Calib Vol(ug)	MW	Rf
1	2431.00	71519.00	-	497.371	0.422
2	1666.00	57783.00	-	402.881	0.481
3	2720.00	77010.00	-	288.427	0.572
4	2439.50	57358.00	-	189.450	0.722

Reporting Tool version 12.3
 Time of Report: 2:54 PM 9/27/2013 (Central America Standard Time)



Lane Data Report: uvp015610.jpg, Lane 4

Summary

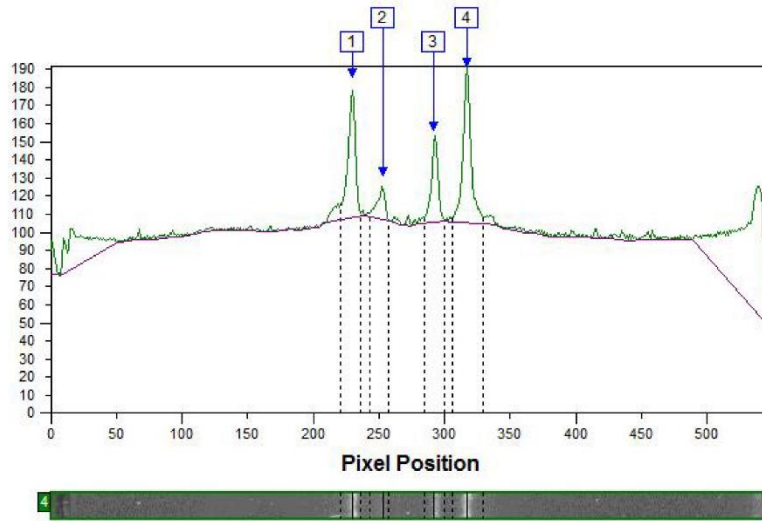
Name: Lane 4

Background

Background Type: Rolling Ball
 Rolling Ball Radius: 100

Band Detection

Automatic Detection: No
 Edge Detection Method: Automatic Edges
 Band Positions Edited: Yes



Band Table

Band No	Volume	Vol+BKGnd	Calib Vol(ug)	MW	Rf
1	20279.24	91477.00	-	500.000	0.420
2	5251.21	71553.00	-	434.200	0.463
3	12116.14	81804.00	-	333.775	0.534
4	26516.60	133025.00	-	281.432	0.580

Reporting Tool version 12.3
 Time of Report: 2:54 PM 9/27/2013 (Central America Standard Time)



Lane Data Report: uvp015610.jpg, Lane 5

Summary

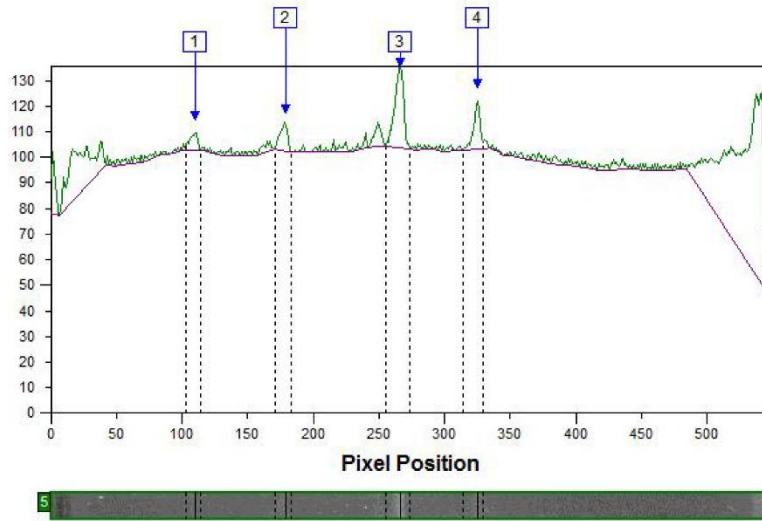
Name: Lane 5

Background

Background Type: Rolling Ball
 Rolling Ball Radius: 100

Band Detection

Automatic Detection: No
 Edge Detection Method: Automatic Edges
 Band Positions Edited: Yes



Band Table

Band No	Volume	Vol+BKGnd	Calib Vol(ug)	MW	Rf
1	2057.00	51799.00	-	1021.292	0.201
2	3196.00	57358.00	-	670.079	0.327
3	10882.68	93092.00	-	394.461	0.486
4	4479.50	72488.00	-	268.862	0.594

Reporting Tool version 12.3
 Time of Report: 2:54 PM 9/27/2013 (Central America Standard Time)



Lane Data Report: uvp015610.jpg, Lane 6

Summary

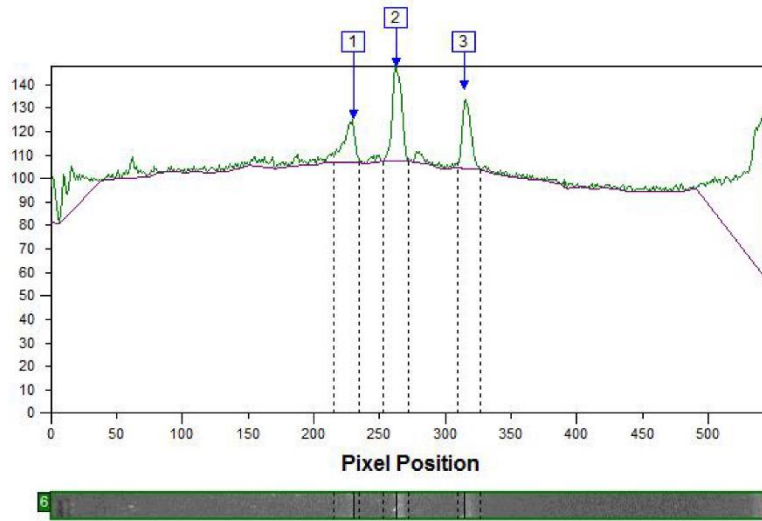
Name: Lane 6

Background

Background Type: Rolling Ball
 Rolling Ball Radius: 100

Band Detection

Automatic Detection: No
 Edge Detection Method: Automatic Edges
 Band Positions Edited: Yes



Band Table

Band No	Volume	Vol+BKGnd	Calib Vol(ug)	MW	Rf
1	7801.69	106199.00	-	500.000	0.421
2	14858.00	108851.00	-	402.932	0.482
3	10892.14	97155.00	-	283.266	0.577

Reporting Tool version 12.3
 Time of Report: 2:54 PM 9/27/2013 (Central America Standard Time)



Lane Data Report: uvp015610.jpg, Lane 7

Summary

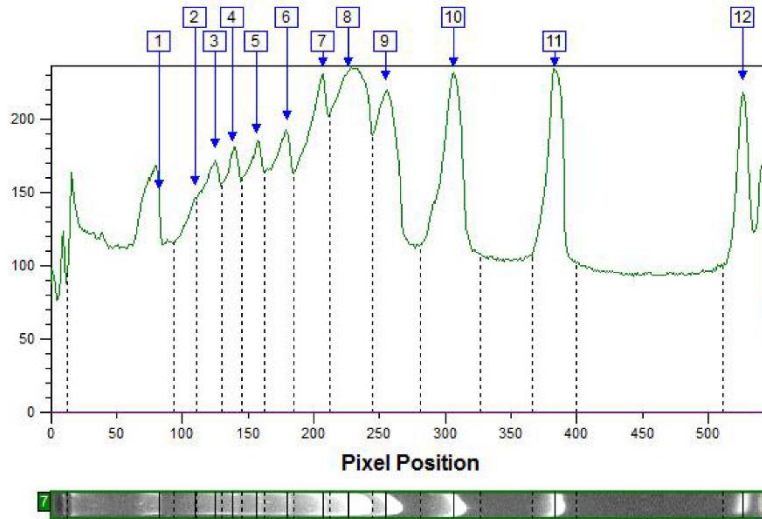
Name: Lane 7

Background

Background Type: None Calculated

Band Detection

Automatic Detection: No
 Edge Detection Method: Automatic Edges
 Band Positions Edited: Yes



Band Table

Band No	Volume	Vol+BKGnd	Calib Vol(ug)	MW	Rf
1	496434.00	496434.00	-	1267.353	0.152
2	105179.00	105179.00	-	1021.292	0.201
3	144908.00	144908.00	-	1014.856	0.229
4	120581.00	120581.00	-	934.192	0.253
5	148206.00	148206.00	-	793.623	0.288
6	185521.00	185521.00	-	665.379	0.330
7	253912.00	253912.00	-	563.720	0.379
8	353277.00	353277.00	-	510.546	0.414
9	289748.00	289748.00	-	427.894	0.467
10	345593.00	345593.00	-	300.000	0.560
11	255374.00	255374.00	-	200.000	0.701
12	240363.00	240363.00	-	101.520	0.963

Reporting Tool version 12.3
 Time of Report: 2:54 PM 9/27/2013 (Central America Standard Time)



Lane Data Report: uvp015610.jpg, Lane 8

Summary

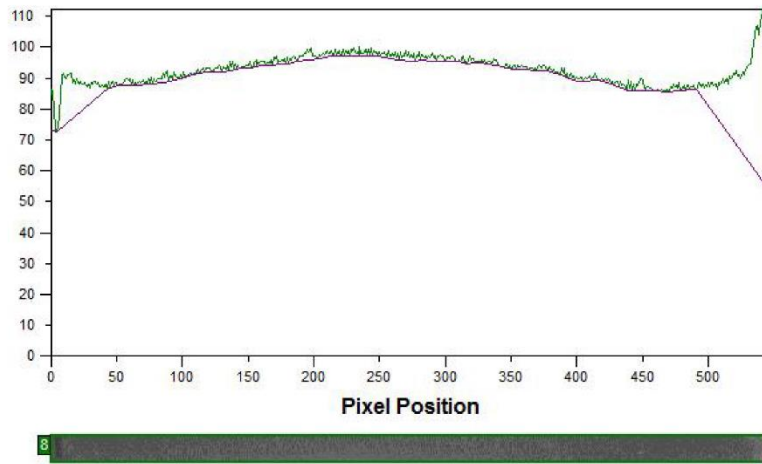
Name:	Lane 8
--------------	--------

Background

Background Type:	Rolling Ball
Rolling Ball Radius:	100

Band Detection

Automatic Detection:	No
Edge Detection Method:	Automatic Edges
Band Positions Edited:	No



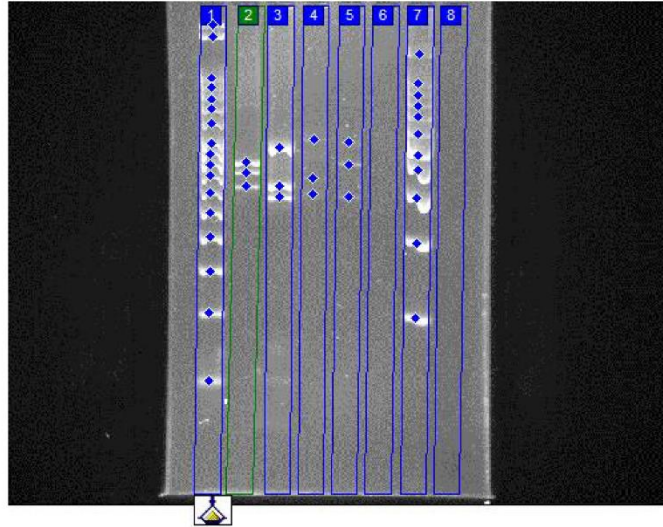
Band Table

6. Gel 28 de agosto

Reporting Tool version 12.3
Time of Report: 4:06 PM 9/27/2013 (Central America Standard Time)



Analysis Report: uvp015694.jpg



Lane Table

Lane	Bands	Band Volume	Lane Volume
Lane 1	17	518385.09	555388.89
Lane 2	3	153824.50	240863.89
Lane 3	3	215135.00	415648.75
Lane 4	3	42075.00	154113.50
Lane 5	3	55377.50	106190.36
Lane 6	0	0.00	67293.19
Lane 7	11	461737.00	568980.80
Lane 8	0	0.00	55036.81

Reporting Tool version 12.3
 Time of Report: 4:06 PM 9/27/2013 (Central America Standard Time)



Lane Data Report: uvp015694.jpg, Lane 1

Summary

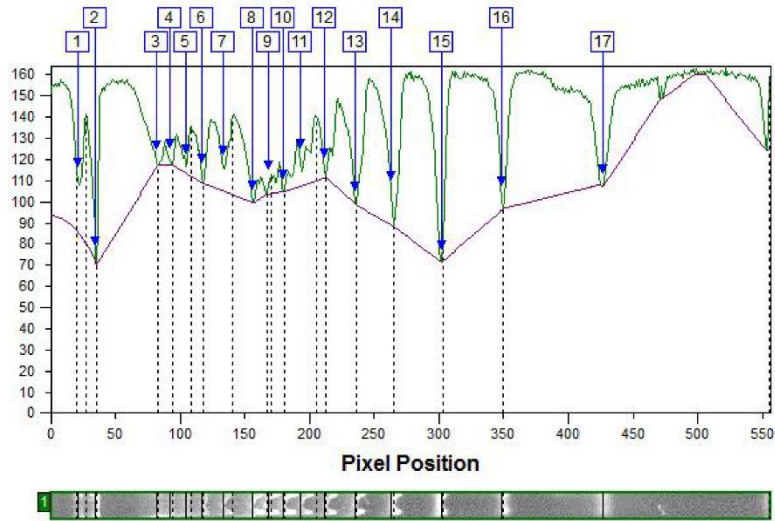
Name: Lane 1

Background

Background Type: Rolling Ball
 Rolling Ball Radius: 100

Band Detection

Automatic Detection: No
 Edge Detection Method: Automatic Edges
 Band Positions Edited: Yes



Band Table

Band No	Volume	Vol+BKGnd	Calib Vol(ug)	MW	Rf
1	6843.79	24497.00	-	3000.000	0.038
2	9940.85	30532.00	-	2000.000	0.063
3	72777.00	204306.00	-	1000.000	0.148
4	1326.00	40035.00	-	900.000	0.166
5	4345.63	56015.00	-	800.000	0.189
6	4468.88	34323.00	-	700.000	0.211
7	14628.95	87890.00	-	600.000	0.240
8	13786.55	92973.00	-	500.000	0.281
9	332.15	9673.00	-	450.000	0.303
10	2302.85	36754.00	-	400.000	0.324
11	9749.50	86939.00	-	350.000	0.348
12	4836.50	31399.00	-	300.000	0.382
13	16711.00	89437.00	-	250.000	0.423
14	36278.00	117776.00	-	200.000	0.474
15	64557.50	155703.00	-	150.000	0.544
16	91944.50	210596.00	-	100.000	0.629
17	163555.45	940491.00	-	50.000	0.769

Reporting Tool version 12.3
 Time of Report: 4:06 PM 9/27/2013 (Central America Standard Time)



Lane Data Report: uvp015694.jpg, Lane 2

Summary

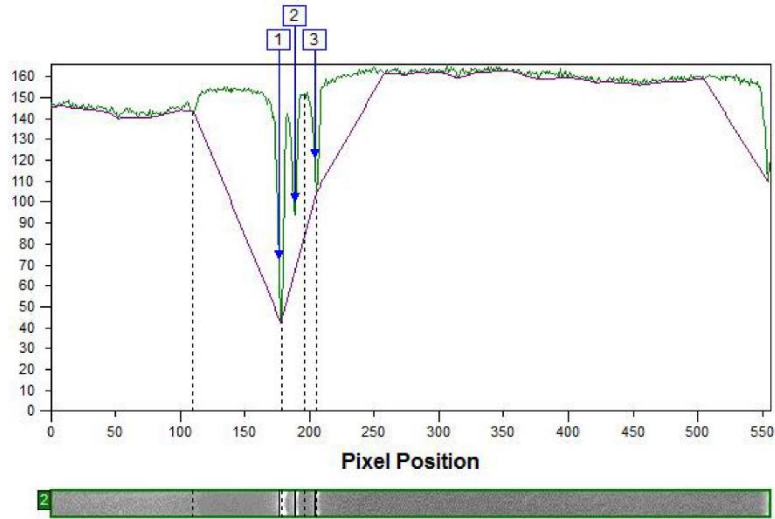
Name: Lane 2

Background

Background Type: Rolling Ball
 Rolling Ball Radius: 100

Band Detection

Automatic Detection: No
 Edge Detection Method: Automatic Edges
 Band Positions Edited: Yes



Band Table

Band No	Volume	Vol+BKGnd	Calib Vol(ug)	MW	Rf
1	110780.50	304079.00	-	412.417	0.319
2	29759.15	61727.00	-	364.185	0.341
3	13284.85	38318.00	-	318.669	0.368

Reporting Tool version 12.3
 Time of Report: 4:06 PM 9/27/2013 (Central America Standard Time)



Lane Data Report: uvp015694.jpg, Lane 3

Summary

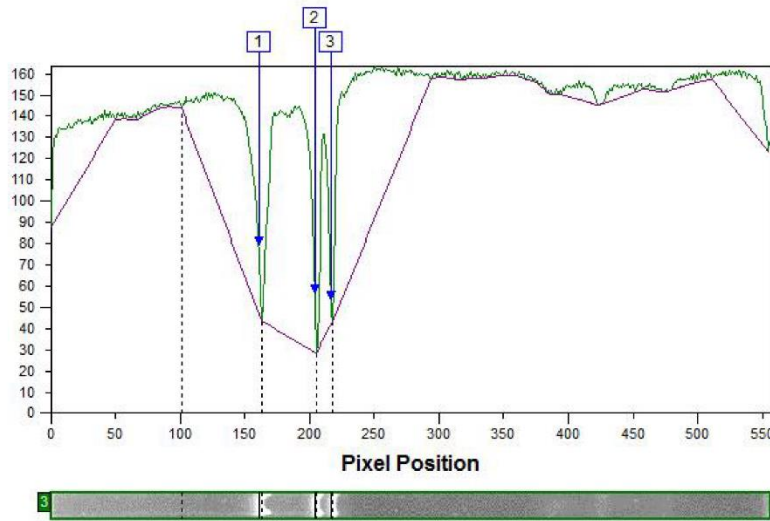
Name: Lane 3

Background

Background Type: Rolling Ball
 Rolling Ball Radius: 100

Band Detection

Automatic Detection: No
 Edge Detection Method: Automatic Edges
 Band Positions Edited: Yes



Band Table

Band No	Volume	Vol+BKGnd	Calib Vol(ug)	MW	Rf
1	83665.50	259607.00	-	479.312	0.290
2	110916.50	156485.00	-	318.669	0.368
3	20553.00	34255.00	-	288.743	0.391

Reporting Tool version 12.3
 Time of Report: 4:06 PM 9/27/2013 (Central America Standard Time)



Lane Data Report: uvp015694.jpg, Lane 4

Summary

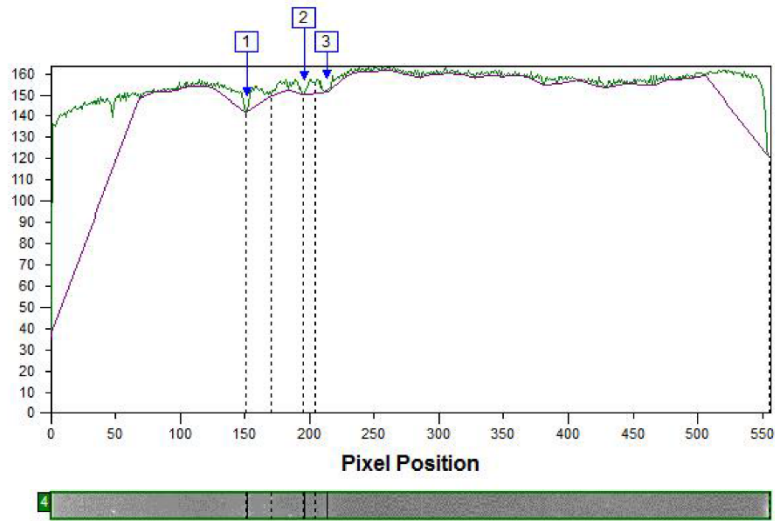
Name: Lane 4

Background

Background Type: Rolling Ball
 Rolling Ball Radius: 100

Band Detection

Automatic Detection: No
 Edge Detection Method: Automatic Edges
 Band Positions Edited: Yes



Band Table

Band No	Volume	Vol+BKGnd	Calib Vol(ug)	MW	Rf
1	3043.00	85935.00	-	516.315	0.274
2	1050.00	41667.00	-	340.440	0.353
3	37982.00	1670590.00	-	295.484	0.386

Reporting Tool version 12.3
 Time of Report: 4:06 PM 9/27/2013 (Central America Standard Time)



Lane Data Report: uvp015694.jpg, Lane 5

Summary

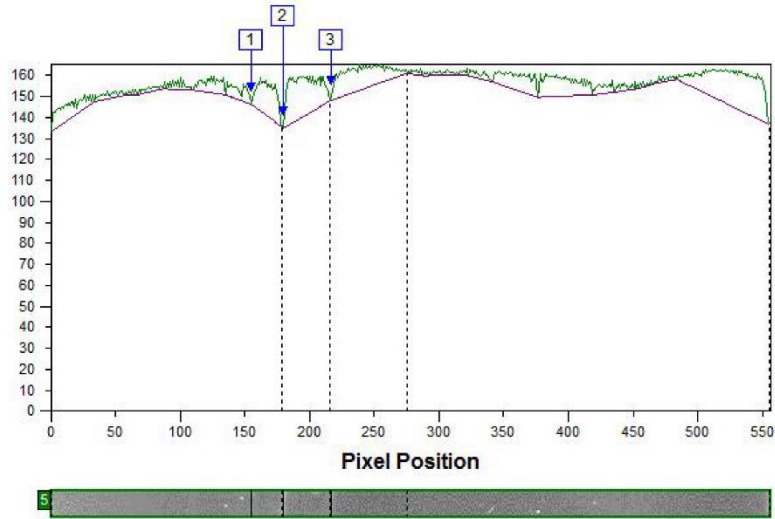
Name: Lane 5

Background

Background Type: Rolling Ball
 Rolling Ball Radius: 100

Band Detection

Automatic Detection: No
 Edge Detection Method: Automatic Edges
 Band Positions Edited: Yes



Band Table

Band No	Volume	Vol+BKGnd	Calib Vol(ug)	MW	Rf
1	25428.60	813841.00	-	504.092	0.279
2	16280.90	172839.00	-	400.000	0.324
3	13668.00	286790.00	-	288.743	0.391

Reporting Tool version 12.3
 Time of Report: 4:06 PM 9/27/2013 (Central America Standard Time)



Lane Data Report: uvp015694.jpg, Lane 6

Summary

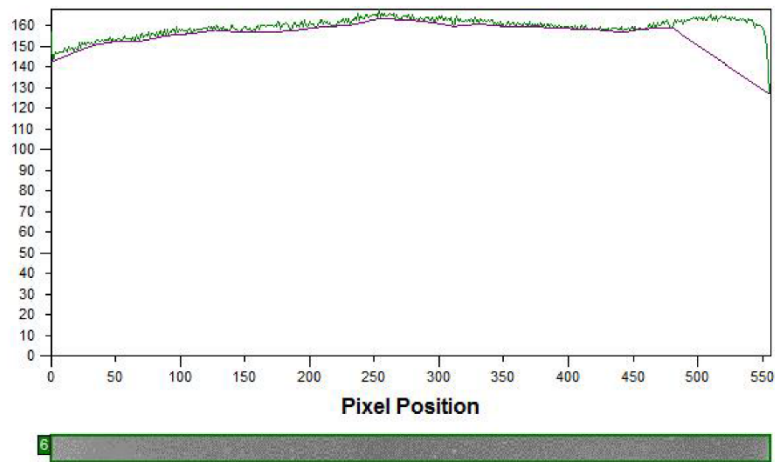
Name: Lane 6

Background

Background Type: Rolling Ball
 Rolling Ball Radius: 100

Band Detection

Automatic Detection: No
 Edge Detection Method: Automatic Edges
 Band Positions Edited: No



Band Table

Reporting Tool version 12.3
 Time of Report: 4:06 PM 9/27/2013 (Central America Standard Time)



Lane Data Report: uvp015694.jpg, Lane 7

Summary

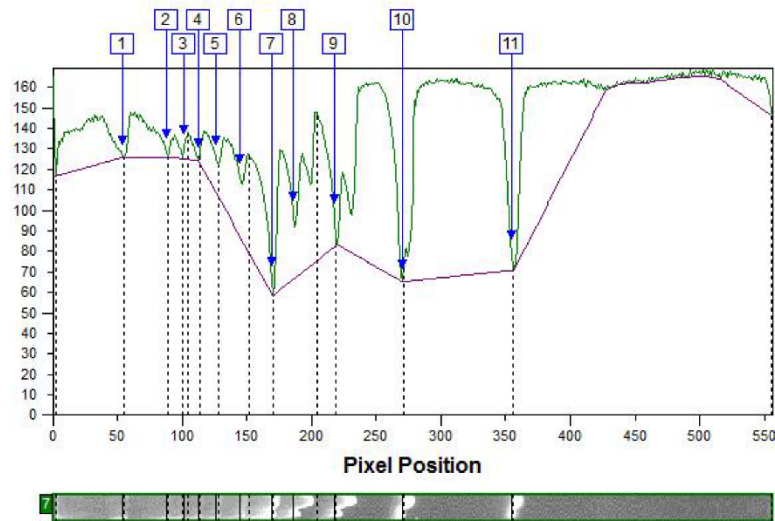
Name: Lane 7

Background

Background Type: Rolling Ball
 Rolling Ball Radius: 100

Band Detection

Automatic Detection: No
 Edge Detection Method: Automatic Edges
 Band Positions Edited: Yes



Band Table

Band No	Volume	Vol+BKGnd	Calib Vol(ug)	MW	Rf
1	26435.00	215611.00	-	1285.625	0.097
2	13923.00	142239.00	-	939.928	0.159
3	1080.15	19839.00	-	829.576	0.182
4	1877.85	35479.00	-	732.991	0.204
5	7168.63	55658.00	-	638.311	0.227
6	23397.37	90746.00	-	545.169	0.261
7	20978.00	58412.00	-	445.808	0.305
8	47724.44	115651.00	-	375.688	0.335
9	22706.60	58174.00	-	286.506	0.393
10	90794.96	206856.00	-	189.720	0.486
11	205649.00	379049.00	-	94.765	0.640

Reporting Tool version 12.3
 Time of Report: 4:06 PM 9/27/2013 (Central America Standard Time)



Lane Data Report: uvp015694.jpg, Lane 8

Summary

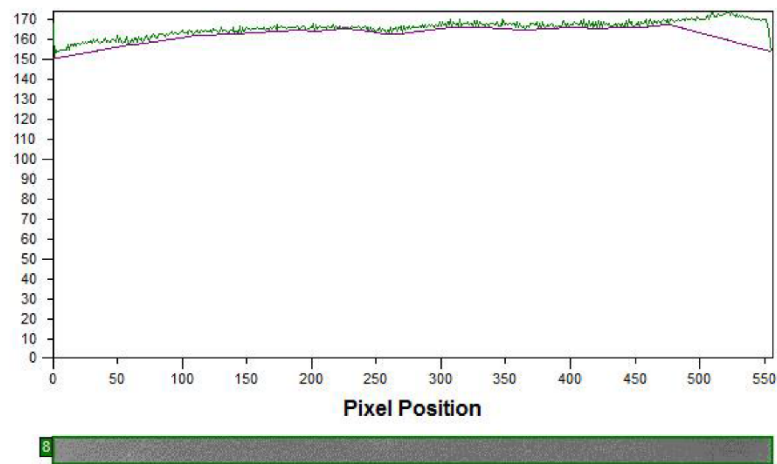
Name:	Lane 8
--------------	--------

Background

Background Type:	Rolling Ball
Rolling Ball Radius:	100

Band Detection

Automatic Detection:	No
Edge Detection Method:	Automatic Edges
Band Positions Edited:	No



Band Table