

# Estructuración genética de poblaciones de palmeras en el neotrópico derivado de marcadores microsatélites (SSRs)

Genetic structure of Neotropical palms derived from microsatellite markers (SSRs)

Rommel Montúfar-Galárraga & José Manuel Barreiro

Lab. Genética Molecular (113), Pontificia Universidad Católica del Ecuador (PUCE),  
Av. 12 de Octubre y Av. Patria, Quito, Ecuador,  
Email: [rjmontufar@puce.edu.ec](mailto:rjmontufar@puce.edu.ec) Autor de correspondencia, [josemanuel\\_barreiro@hotmail.com](mailto:josemanuel_barreiro@hotmail.com)

## Resumen

El interés por estudios de estructuración genética de poblaciones de palmeras y su implicación en la conservación de la biodiversidad se ha incrementado en los últimos años. El presente documento describe la metodología a ser utilizada por el proyecto PALMS para estudios de estructuración genética de poblaciones silvestres de las palmeras: *Oenocarpus bataua*, *Euterpe precatoria*, *Ceroxylon echinulatum*, *Prestoea acuminata* y *Phytelephas aequatorialis*. El estudio se llevará a cabo en las regiones tropicales, subtropicales y montañas de los países integrantes del proyecto PALMS (Colombia, Ecuador, Perú y Bolivia). Se utilizará marcadores microsatélites (SSRs), obtenidos por aislamiento directo de las especies estudiadas o vía transferencia de marcadores disponibles en la literatura, para obtener una aproximación de la dinámica genética de las poblaciones de palmeras en la región. **Palabras clave:** Arecaceae, Diversidad genética, Estructuración genética, Microsatélites, SSRs.

## Abstract

The interest for studies of genetic diversity of palm populations and their use in biodiversity conservation have increased in recent years. This paper describes a methodology to be used by the PALMS project for studies of genetic structure of palm populations. The palm species included in this study are: *Oenocarpus bataua*, *Euterpe precatoria*, *Ceroxylon echinulatum*, *Prestoea acuminata*, and *Phytelephas aequatorialis*. This project will be carried out on tropical, subtropical and montane areas of Colombia, Ecuador, Peru, and Bolivia. Genetic studies will apply informative molecular markers as microsatellites (SSRs) described in the literature, and those obtained by SSR marker transfers between closer species.

**Keywords:** Arecaceae, Genetic diversity, Genetic structure, Microsatellites, SSRs.

## Introducción

Las actividades antropogénicas, como la deforestación, tala selectiva, degradación de hábitat y extractivismo destructivo, amenazan la sobrevivencia de las especies forestales. Estas actividades generan impactos negativos sobre la estructura y diversidad genética de las poblaciones, a través de la alteración de los mecanismos de flujo génico y selección natural en los ecosistemas forestales (Hamilton 1999). Si, la diversidad genética de un especie es erosionada, la resiliencia de la especie y de los ecosistemas será seriamente amenazada frente a cambios climáticos, polución, invasiones, y enfermedades (Schaberg *et al.* 2008). Por este motivo, el conocimiento

de la estructura genética de las poblaciones, y sus mecanismos involucrados, constituye una herramienta para medir la salud ecológica y su capacidad de resiliencia frente a perturbaciones antropogénicas y naturales.

Los estudios de estructuración genética en poblaciones naturales de palmeras en el Neotrópico son relativamente escasos (Tabla

1). A partir del final de la década de los 90, se publican en revistas internacionales los primeros artículos explorando la estructura genética de palmeras en las Américas. La estructuración genética de poblaciones, biogeografía, análisis de paternidad y flujo génico son las principales temáticas estudiadas. Estos estudios fueron realizados con un reducido número de

**Tabla 1.** Estudios de estructuración genética aplicados a especies de palmeras en el Neotrópico. Leyenda de siglas en inglés: AFLP = Amplified Fragment Length Polymorphism, ISSR = Inter-Simple Sequence Repeats, SSR = Simple Sequence Repeats (microsatélites).

Espece	Tema	Marcador molecular	Autor
<i>Astrocaryum mexicanum</i>	Estructuración genética	Alozimas	Eguiarte <i>et al.</i> 1992
<i>Bactris gasipaes</i>	Estructuración genética	AFLP	Adin <i>et al.</i> 2004
<i>Bactris gasipaes</i>	Estructuración genética	SSR	Cole <i>et al.</i> 2006
<i>Bactris gasipaes</i>	Estructuración genética	SSR	Couvreur <i>et al.</i> 2006
<i>Bactris gasipaes</i>	Estructuración genética	SSR	Hernández <i>et al.</i> 2008
<i>Ceroxylon echinulatum</i>	Genética del paisaje	SSR	Trénel <i>et al.</i> 2008
<i>Ceroxylon echinulatum</i>	Estructuración genética	SSR	Montúfar (no publicado)
<i>Ceroxylon sasaimae</i>	Estructuración genética	SSR	Gaitan 2003
<i>Ceroxylon. alpinum</i>	Estructuración genética	SSR	Gaitan 2003
<i>Chamaedorea alternans</i>	Taxonomía	AFLP	Bacon & Bailey 2006
<i>Chamaedorea elatior</i>	Estructuración genética	Alozimas	Luna <i>et al.</i> 2005
<i>Chamaedorea elatior</i>	Variabilidad genética	Alozimas	Luna <i>et al.</i> 2007
<i>Chamaedorea ernesti-augusti</i>	Estructuración genética	SSR	Cibrián-Jaramillo <i>et al.</i> 2009
<i>Chamaedorea tepejilote</i>	Estructuración genética	Alozimas	Luna <i>et al.</i> 2005
<i>Chamaedorea tepejilote</i>	Variabilidad genética	Alozimas	Luna <i>et al.</i> 2007
<i>Chamaedorea tepejilote</i>	Taxonomía	AFLP	Bacon & Bailey 2006
<i>Elaeis oleifera</i>	Estructuración genética	RAPD	Moretzsohn <i>et al.</i> 2002
<i>Euterpe edulis</i>	Estructuración genética	SSR	Gaiotto <i>et al.</i> 2003
<i>Euterpe edulis</i>	Estructuración genética	AFLP	Cardoso <i>et al.</i> 2000
<i>Euterpe edulis</i>	Estructuración genética	Alozimas	Conte <i>et al.</i> 2003
<i>Euterpe edulis</i>	Estructuración genética	SSR/Alozimas	Conte <i>et al.</i> 2008
<i>Geonoma macrostachys</i>	Taxonomía	ISSR	Roncal <i>et al.</i> 2007
<i>Iriartea deltoidea</i>	Estructuración genética	AFLP	Sezen <i>et al.</i> 2007
<i>Oenocarpus bataua</i>	Variabilidad genética	SSR	Montúfar 2007
<i>Oenocarpus bataua</i>	Estructuración genética	SSR	Karubian <i>et al.</i> 2010
Varias especies	Variabilidad genética	Isozimas/ RAPD	Sawazaki <i>et al.</i> 1998

especies (< 15 especies), de diferentes sistemas reproductivos, hábitats y aplicando diferentes tipos de marcadores moleculares (isozimas, alozimas, RAPD, AFLP, ISSR, SSR).

La falta de marcadores moleculares informativos es un limitante en el estudio de la estructura genética en poblaciones vegetales del Neotrópico. Durante la última década, el desarrollo de nuevas técnicas moleculares de secuenciación facilita un arsenal de nuevos instrumentos para explorar de diversidad genética de las especies. En particular, los marcadores microsatélites o SSRs (Simple Sequence Repeats) constituyen una poderosa herramienta para estudios genéticos. Lamentablemente, la disponibilidad de información molecular en palmeras, y en particular de las especies neotropicales, es un limitante para el aislamiento y construcción de marcadores co-dominantes, polimórficos y multi-alélicos como los SSRs.

Dentro de las actividades del work package 2 –Resiliencia de ecosistemas y límites de funcionamiento– del proyecto PALM FP-7, se realizará estudios de estructuración genética para las especies *Oenocarpus bataua*, *Euterpe precatoria* y *Ceroxylon echinulatum*. Estos estudios serán planificados a nivel regional incluyendo poblaciones de los países participantes. Para cada especie se planteará un tema específico de investigación (genética del paisaje, estructuración genética, biogeografía). La base metodológica de los estudios a realizar dentro del programa PALMS sigue lineamientos generales para las especies a ser estudiadas.

## Objetivos

El presente documento propone lineamientos generales para una metodología de estudios en estructuración genética de poblaciones de palmeras neotropicales con la aplicación de marcadores microsatélites (SSRs). Se establece un procedimiento y sugerencias a ser tomados en cuenta para estudios similares en el Neotrópico.

## Protocolo Selección de especies a estudiar

La selección de especies a estudiar se basó en los siguientes criterios: 1) Amplia distribución geográfica en los países integrantes del Proyecto PALMS FP-7 (Colombia, Ecuador, Perú y Bolivia), 2) importancia económica actual o potencial en la región, 3) disponibilidad de marcadores SSRs para la especie. Las especies seleccionadas fueron son las siguientes:

- ***Oenocarpus bataua***: Es una palmera de dosel ampliamente distribuida en las regiones tropicales y subtropicales de América del Sur, incluyendo poblaciones andinas alrededor de los 1.200m. Existen referencias que reportan la importancia económica de esta especie como una nueva fuente de aceites comestibles proveniente de sus frutos (Balick & Gershoff 1981, Montúfar *et al.* 2010). Adicionalmente, industrias locales en las capitales amazónicas generan un movimiento significativo de este recurso natural con proyecciones económicas a mayor escala. Para *O. bataua* se dispone de un juego de 23 marcadores SSRs aislados para la especie (Montúfar *et al.* 2007) y de ocho marcadores SSRs aislados para la especie hermana *O. bacaba* (Lepsch-Cunha *et al.* 2003).
- ***Euterpe precatoria***: Es una palmera de dosel con amplia distribución geográfica en regiones tropicales y subtropicales de América del Sur. Esta especie es altamente valorada por su palmito, el cual es intensamente comercializado en varias regiones de la Amazonía y en la región del Chocó. Marcadores para especies del género *Euterpe* han sido descritos por Gaiotto *et al.* (2001).
- ***Ceroxylon echinulatum***: Palmera de dosel distribuida en las regiones andinas de Ecuador y norte de Perú entre los 1.600 a 2.200m. Las hojas jóvenes son intensamente cosechadas durante las festividades

religiosas de Semana Santa para la elaboración de artesanías. Gaitan (2003) reporta un amplio juego de marcadores SSRs para *C. alpinum* y *C. sasaimae*.

- Adicionalmente, se incluyeron dos modelos locales para estudios de genética de poblaciones restringidos a Ecuador. *Prestoea acuminata*, que es una palmera cespitosa de sotobosque, ampliamente distribuida en las regiones andinas entre los 1.000 a 2.000 m y *Phytelephas aequatorialis*: endémica de los bosques tropicales y secos del litoral ecuatoriano.

### Área de estudio

El área de estudio del proyecto PALMS se circunscribe a las regiones tropicales, subtropicales y andinas de Colombia, Ecuador, Perú y Bolivia. En particular, las actividades del WP 2 se limitan a las regiones geográficas de distribución de los modelos biológicos a estudiar. Estudios de estructuración genética de *Euterpe precatoria* serán desarrollados con poblaciones silvestres provenientes de las regiones biogeográficas del Chocó, la Amazonía y los Andes, en un rango altitudinal entre 100-1.200 m. Para la palmera *Oenocarpus bataua* se incluirán poblaciones del Chocó, Amazonía y poblaciones andinas hasta los 1.250 m de altitud provenientes de Perú y Ecuador. Los estudios con *Ceroxylon* son restringidos a los bosques montanos entre los 1.600 a 2.200 m de altitud de los Andes ecuatorianos. Para la palmera de tagua (*Phytelephas aequatorialis*) se analizarán poblaciones provenientes de los bosques tropicales y secos del litoral de Ecuador y para *Prestoea acuminata* se planificará un estudio local de poblaciones en los bosques andinos a 1.200-2.500 m de altitud en los Andes septentrionales de Ecuador.

### Colección de tejidos vegetales

La colección de material vegetal para aislamiento de ADN ha sido tradicionalmente

basada en tejidos foliares jóvenes. Sin embargo, la altura de la palmera es un limitante para la obtención de este material foliar. Cuando la obtención de hojas es inaccesible, una opción constituye el aislamiento de ADN proveniente de los tejidos del meristemo apical en las raíces adventicias. Estudios y ensayos realizados actualmente con tejidos radicales han proporcionado resultados positivos en el aislamiento de ADN en los géneros *Ceroxylon*, *Oenocarpus*, *Prestoea* y *Euterpe*. Trene *et al.* (2008) reportaron el uso del tejido radical en el género *Ceroxylon* para aislamiento de ADN. Para la obtención de los tejidos radicales adecuados, se obtienen las raíces adventicias jóvenes que generalmente son de color amarillo o rojo. Se corta el meristemo apical, *c.a.* 5 cm de la raíz, y posteriormente se guarda este material de raíz en bolsas plásticas con abundante sílica gel. Otra opción es la conservación del tejido de raíz en alcohol al 95%. Para palmeras de tamaño mediano, como *Prestoea* o *Phytelephas* se colectaron directamente tejidos foliares jóvenes provenientes de la estípula y posteriormente deshidratados con sílica gel.

### Selección de los marcadores microsatélites (SSRs)

Los microsatélites o SSRs (siglas en inglés: Simple Sequence repeats) son marcadores moleculares de segunda generación basados en la técnica de PCR (siglas en inglés: *Polymerase Reaction Chain*) y descritos por primera vez por Akkaya *et al.* (1992). Estos marcadores están constituidos de cortos *motivos* nucleotídicos (di, tri, tetra o penta) que se repiten una tras el otro (en *tandem*). Un ejemplo de microsatélites es el di-nucleótido 5'...AC...3', el cual ha sido reportado 80.330 veces en diferentes lugares del genoma humano. Los cebadores (primers) para estos marcadores se construyen sobre las regiones adyacentes de las secuencias repetitivas (en inglés: *flanking regions*). Las propiedades que han hecho de los microsatélites los marcadores

más utilizados en estudios de mapeo genético y análisis de variabilidad genética son: 1) Los SSRs son abundantes en el genoma eucarionte. Por ejemplo, el genoma humano tiene un microsatélite por cada 2 kb de ADN humano (Hartl & Jones 2009). 2) Los SSRs son altamente polimórficos. El polimorfismo en SSRs radica en el número de repeticiones del motivo, generando tantos alelos como tantas variaciones en el número de motivos. 3) Los SSRs son marcadores co-dominantes. Esto se refiere a que permiten detectar la presencia de los dos alelos y consecuentemente determinar la naturaleza homocigótica o heterocigótica de un individuo para un marcador dado. 4) La amplificación vía técnica PCR de SSRs requiere mínima cantidad de ADN (5-100 ng por reacción) e inclusive marcadores SSRs dan resultados positivos en ADN degradados. 5) Los SSRs son altamente reproducibles, lo que permite la comparación de patrones genéticos entre laboratorios (Jones *et al.* 1997).

Una limitante para el uso de marcadores SSRs en estudios genéticos es la complejidad técnica que involucra el aislamiento de estos marcadores para una especie en particular (Squirrell *et al.* 2003). Este procedimiento requiere la construcción de librerías genéticas, el aislamiento de secuencias microsatélites y la secuenciación de estas regiones para la construcción de los cebadores en las zonas adyacentes de las repeticiones del motivo. Las limitaciones técnicas en la implementación de estos métodos han constituido un impedimento para el aislamiento de nuevas baterías microsatélites para especies vegetales y animales. Una opción ante la ausencia de marcadores constituye la transferencia de SSRs entre especies filogenéticamente relacionados. Si bien, el aislamiento de SSRs es un proceso técnicamente complejo y costoso, una vez seleccionado los marcadores (vía aislamiento o por transferencia), la aplicación de estos marcadores requiere de mínimas demandas técnicas y un bajo costo operacional.

## Transferencia de marcadores moleculares

La disponibilidad de marcadores SSRs es significativamente mayor para especies provenientes de climas templados, subtropicales y especies de importancia económica. Este patrón refleja las limitaciones técnicas de los países en vías de desarrollo para el aislamiento de marcadores para especies tropicales y endémicas. Ante esta ausencia de marcadores, la transferencia de SSRs es un procedimiento que favorece la optimización de herramientas genéticas para especies de las cuales no disponemos de información molecular. En base a una recopilación de estudios de transferencia de SSRs entre los años 1997 y 2006 (Barbara *et al.* 2007) se detectaron las siguientes tendencias:

1. El grupo taxonómico influye en el éxito de transferencia. Mayor éxito de transferencia fue reportado entre especies dentro de géneros de reptiles, aves y mamíferos. Un importante resultado mencionado por Barbara *et al.* (2007) es la baja tasa de transferencia en el grupo de las monocotiledóneas, tanto entre especies dentro de un género, como entre géneros. Ensayos realizados en la transferencia de SSRs del género de palmeras *Euterpe* (Gaiotto *et al.* 2001) hacia el género *Prestoea*, reportaron una baja tasa de éxito; de 14 SSRs de *Euterpe* apenas dos marcadores dieron resultados positivos para *Prestoea* (R. Montúfar, datos no publicados). Sin embargo, se ha reportado resultados positivos en la transferencia de SSRs del género de palmeras *Oenocarpus* (Montúfar *et al.* 2007) hacia el género *Prestoea* (de 25 SSRs, 13 dieron señal positiva). La evidencia de una baja tasa de transferencia de marcadores en palmeras no ha sido sistemáticamente estudiada; sin embargo, evidencias aisladas sugieren que es variable y que otros factores como la calidad en el diseño de cebadores podrían determinar el éxito o fracaso de un proceso de transferencia.

2. La transferencia es más efectiva entre especies dentro de un género, seguido de la transferencia entre géneros dentro de una familia. Ensayos de transferencia entre géneros de palmeras ha generado diferentes resultados dependiendo de las relaciones filogenéticas entre taxa. Gaitán (2003) transfirió diez SSRs de *Ceroxylon alpinum* a *C. sasaimae* de un total de 18 marcadores disponibles; y 5 SSRs de *C. sasaimae* a *C. alpinum* de una base de 11 marcadores disponibles. La transferencia de SSRs entre géneros de la tribu *Euterpeae* presentó tasas de éxito significativas (Montúfar *et al.* 2007). Sin embargo, la transferencia de SSRs del género *Bactris* (Tribu *Cocoseae*) al género *Prestoea* (Tribu *Euterpeae*) no produjo ningún marcador con señal positiva (R. Montúfar, datos no publicados).
3. El sistema de reproductivo y tasa generacional de la especie influyen en éxito de transferencia. Estos factores no han sido analizados en palmeras.

Los primeros juegos de SSRs para palmeras fueron aislados de especies de importancia económica como *Elaeis guineensis* (palma africana) y *Cocos nucifera* (cocotero; Perera *et al.* 1999, Rivera *et al.* 1999).

Durante la presente década un número mayor de baterías de SSRs son reportados en la literatura. En particular, la tribu *Cocoseae* y *Euterpeae* están relativamente bien representadas por marcadores, lo contrario puede observarse para el resto de subfamilias y otras tribus dentro de *Arecoideae*. Las especies de las cuales se dispone marcadores SSRs son descritas en la tabla 2. A pesar de la importancia de la disponibilidad de marcadores, reportes sobre las tasas de transferencia y polimorfismo en *Areceaceae* son escasamente reportados en la literatura. De veinte y tres marcadores SSRs aislados de *Oenocarpus bataua* (*Euterpeae*), 18 amplificaron en cinco especies hermanas dentro del género (*O. bacaba*, *O. balicki*, *O. mapora*, *O. minor*, *O. distichus*) y 11 de estos mismos loci amplificaron en géneros de la tribu *Euterpeae* (*Euterpe*, *Hyospatha*, *Prestoea*, *Neonicholsonia*; Montúfar *et al.* 2007), reportando una alta tasa de transferencia a nivel de tribu. De igual manera, Billote *et al.* (2004a) describieron la transferencia de 16 marcadores SSRs aislados de *Bactris gasipaes* a seis especies dentro del mismo género y para otros géneros (*Astrocaryum*, *Elaeis*) dentro de la misma tribu *Cocoseae*. Estudios que reportan tasas de transferencia

**Tabla 2.** Marcadores microsatélites (SSRs) aislados para palmeras neotropicales. Sistema taxonómico según Dransfield *et al.* 2008.

Subfamilia	Tribu	Especie	No. de SSRs	Librería genómica	Literatura
Arecoideae	Chamaedoreae	<i>Chamaedorea elegans</i>	9	varios	Cibrián <i>et al.</i> 2008
		<i>Bactris gasipaes</i>	18	GA	Billote <i>et al.</i> 2004
	Cocoseae	<i>Acrocomia aculeata</i>	8	varios	Nucci <i>et al.</i> 2008
		<i>Elaeis guineensis</i>	21	GA, GT, CCG	Billote <i>et al.</i> 2001
		<i>Attalea phalerata</i>	14	varios	Choo <i>et al.</i> 2010
		<i>Attalea amygdalina</i>	23	GA, CA, AT	Gaitán 2003
		<i>Oenocarpus bataua</i>	23	GA	Montúfar <i>et al.</i> 2007
	Euterpeae	<i>Oenocarpus bacaba</i>	8	varios	Lepsch-Cunha <i>et al.</i> 2003
		<i>Euterpe edulis</i>	18	AG	Gaiotto <i>et al.</i> 2001
		<i>Ceroxylon sasaimae</i>	10	Múltiples	Gaitán 2003
Ceroxyloideae	Ceroxyleae	<i>Ceroxylon alpinum</i>	18	GA, CT	Gaitán 2003

de SSRs entre tribus o subfamilias de palmeras revelan tasas variables de éxito. Billote *et al.* (2001) reportaron la transferencia de 21 SSRs loci aislados en *Elaeis guineensis* a *E. oleifera* y *Barcella odora* (subtribu *Elaeidinae*) y una baja tasa de transferencia en especies de las subtribus *Bactridinae* / *Attaleinae* (Tribu *Cocoseae*), en la tribu *Euterpeae* y en la subtribu *Mauritiinae*. De 16 SSRs descritos para *Phoenix dactylifera* (subfamilia *Coryphoideae*), 12 dieron resultados positivos para seis especies dentro del género *Astrocaryum* (subfamilia *Arecoideae*), y seis para *Elaeis guineensis* (subfamilia *Arecoideae*; Billote *et al.* 2004b). Transferencias de SSRs positivas son reportadas entre especies dentro de los géneros *Ceroxylon* (Gaitán 2003), *Euterpe* (Gaiotto *et al.* 2001), *Chamaedorea* (Cibrián-Jaramillo *et al.* 2008), *Bactris* (Billote *et al.* 2004) y *Elaeis* (Billote *et al.* 2001).

### Selección de marcadores polimórficos

Los marcadores SSRs que dieron señal positiva durante los análisis de transferencia serán amplificados en un población de referencia de 5-10 individuos de la especie a estudiar, cada individuo representando diferentes localidades. Estos análisis permiten obtener una aproximación de la variación en el número de alelos de los marcadores seleccionados. Los marcadores que resulten polimórficos serán utilizados en los análisis. Los marcadores SSRs aislados de *O. bataua*, y los loci SSRs transferidos a *E. precatoria*, *P. acuminata* y *C. echinulatum* son descritos en el anexo 1. Pruebas de transferencia de marcadores SSRs para *Phytelephas aequatorialis* están en curso.

### Diseño experimental

El diseño a ser aplicado para los estudios de estructuración genética a nivel regional será ejecutado, en un promedio, con 10 poblaciones grandes de 30 individuos distribuidas homogéneamente a lo largo de Colombia, Ecuador, Perú y Bolivia. De una población

grande se colectará el material vegetal proveniente de individuos que estén separados físicamente, al menos a 10 metros de distancia para evitar autocorrelación genética entre las muestras obtenidas. Individuos aislados serán colectados entre las poblaciones grandes con el objetivo de cubrir áreas desprovistas de información entre las poblaciones y generar un gradiente continuo en el área muestreada. Adicionalmente, se incluirán algunos individuos de especies próximas a las especies estudiadas como referencias para los análisis de divergencia molecular. Los estudios moleculares del proyecto PALMS, se implementarán en base a una colección de 300 muestras para cada especie estudiada.

Con la finalidad de asociar los patrones genéticos con variables ambientales a macro-escala se medirá la longitud, latitud y altitud de cada población e individuo. Posteriormente, se obtendrá información de variables climáticas de las localidades muestreadas proveniente de bases de datos.

### Número de muestras y de marcadores SSRs a implementar en los estudios

El número de individuos a ser estudiado dependen de: 1) Las preguntas/hipótesis a ser evaluadas, 2) de la disponibilidad del material vegetal durante las colectas y 3) de la escala espacial de estudio. Pruett & Winker (2008) recomendaron realizar estudios con 20 y 30 muestras para obtener valores confiables de diversidad genética con marcadores SSRs. Sin embargo, estos valores son difíciles de obtener para poblaciones silvestres de palmeras con bajas densidades o físicamente inaccesibles. La mayoría de estudios realizados en palmas (Tabla 1) aplica una amplia variación en el número de individuos que caracterizan las poblaciones estudiadas. La variabilidad en el número de muestras ( $N$ ) producen sesgos en el cálculo de la diversidad genética, diversidad alélica ( $A$ ) o en la heterocigocidad ( $H_e$ ,  $H_o$ ; Leberg 2002, Nybom 2004). Con el objetivo de evitar sesgos

en los estadísticos, se utilizará un número de muestras ( $N$ ) de 30 individuos para caracterizar a las poblaciones en estudio.

El número de marcadores SSR utilizados es variables entre estudios de palmeras. El número de marcadores analizados varía de tres (Cole *et al.* 2006) a 18 SSRs (Gaiotto *et al.* 2003). Para nuestros estudios se realizará el genotipaje con un juego de doce marcadores polimórficos.

Un aspecto importante durante el muestreo de individuos es la influencia del estadio regenerativo en la estructura genética de las poblaciones. Estudios realizados en los géneros *Ceroxylon* (Gaitan 2003) y *Euterpe* (Gaiotto *et al.* 2003) muestran diferencias en la estructura genética entre plántulas versus adultos dentro de una misma población. En particular, poblaciones de plántulas de palmeras presentan mayores índices de endogamia (valores  $F_{IS}$ ) que en poblaciones de individuos adultos. Este patrón ha sido explicado en función de una selección contra individuos homocigotos durante el desarrollo de las poblaciones de palmeras (Gaiotto *et al.* 2003). Con el objetivo de evitar sesgos vinculados al estadio de los individuos, nuestros estudios incluirán solamente individuos juveniles > 2 m y adultos para las especies *Oenocarpus bataua*, *Euterpe precatoria* y *Ceroxylon echinulatum*; y solamente adultos para *Phytelephas aequatorialis* y *Prestoea acuminata*.

### Técnicas de laboratorio

*Aislamiento de ADN y técnica PCR:* Los tejidos vegetales de origen foliar serán triturados mecánicamente o macerados manualmente hasta obtener un polvo fino de la muestra que facilite su extracción. El ADN de las palmeras será aislado con kits de extracción de ADN de las casas comerciales Invitrogen (PureLink PLant-Total DNA Purification Kit), Quiagen (DNeasy Plant Mini Kit) y con protocolos tradicionales (CTAB; Doyle & Doyle 1987). Las muestras de raíces serán procesadas eliminando previamente el tejido externo y la región interna de la raíz rica en fibras vasculares. El producto

restante será macerado manualmente. La *Polymerase Chain Reaction* (PCR) será llevada a cabo bajo protocolos estándares y con las especificaciones de amplificación detallada para cada microsatélite. Si los marcadores microsatélites presentan patrones de múltiples bandas (en inglés: *slippage*) ó baja definición en la lectura de geles de acrilamida se procederá a ajustar los protocolos de cada marcador variando la temperatura de hibridación (PCR) y la concentración de magnesio.

De acuerdo a las disponibilidades técnicas de los laboratorios, el genotipaje de microsatélites en las poblaciones colectadas será realizado con (i) la técnica de electroforesis vertical en acrilamida (Laboratorio PUCE, Quito) o (ii) con el uso de secuenciadores a capilares ABI PRISM-Genetic Analyser (Laboratorio IRD, Montpellier). Para el primer caso, se ensamblan geles de acrilamida manualmente en los cuales los productos PCR migran a través de la matriz gracias a una electroforesis vertical, para posteriormente ser revelados con la técnica de tinción en nitrato de plata. Si bien, este procedimiento involucra un trabajo manual considerable, constituye una técnica de fácil implementación en los laboratorios. Las especificaciones técnicas para cada uno de los pasos son estándares. En el caso de disponer de equipos tecnológicos, como secuenciadores (a láser o con capilares), el tiempo de trabajo de laboratorio se reduce considerablemente.

### Análisis de datos

Una vez obtenidos los patrones alélicos de los microsatélites estos serán registrados en matrices que serán estudiadas mediante tres tipos de análisis estadísticos:

- **Diversidad genética:** Para evaluar la diversidad genética de las especies estudiadas se aplican varias pruebas, análisis e índices estadísticos de diversa naturaleza. Entre éstos están el porcentaje de loci polimórfico, el número promedio



de alelos por locus, índices de distancia y similitud genética (índice de Nei), medida de diversidad  $D_{est}$ , análisis multivariados de clasificación (UPGMA, Neighbour Joining), análisis molecular de variancia (AMOVA) y análisis de componentes principales (PCA). Los programas estadísticos que se utilizarán para esta parte del estudio son ARLEQUIN (Shneider et al. 2005), SMOGD (Crawford 2010), GENETIX (Belkhir et al. 2000) y GENALEX (Pekall & Smouse 2005).

- **Genética de poblaciones clásica:** Estas pruebas estadísticas se basan en modelos de equilibrio bajo los supuestos de Hardy-Weinberg en poblaciones naturales para obtener información de la estructura y dinámica de la diversidad genética de las especies estudiadas. Los análisis de genética de poblaciones clásica se aplicarán a las 10 poblaciones grandes contempladas dentro del diseño experimental. Se calcularán el índice de estructuración poblacional ( $F_{st}$ ), tamaño efectivo de población ( $N_e$ ), heterocigocidad observada y esperada ( $H_o$ ,  $H_e$ ), índice de endogamia ( $F_{is}$ ) y número de migrantes por generación ( $M$ ). Los programas estadísticos que se utilizarán son ARLEQUIN, GENEPOP (Raymond & Rousset 1995) y GENETIX.
- **Genética del paisaje:** Esta nueva aplicación de la ecología molecular combina la información genética de las especies estudiadas con variables geográficas como latitud, longitud, altitud y ambientales. Los modelos generados asignan a los individuos analizados probabilidades de pertenencia a poblaciones genéticamente homogéneas estructuradas por algoritmos basados en métodos bayesianos. Con estos análisis se obtiene resultados de la estructura y composición de poblaciones, barreras para el flujo génico y áreas con alta diversidad genética. Los análisis de genética del paisaje se realizarán en el programa GENELAND (Guillot et al. 2005) para el paquete estadístico de software

libre R y con el programa STRUCTURE (Pritchard et al. 2000). Los estudios en genética del paisaje incluirán a todos los individuos colectados de cada especie estudiada. Adicionalmente se aplicaran pruebas estadísticas paramétricas y no-paramétricas para la exploración de asociación entre patrones moleculares y variables ambientales.

## Referencias

- Adin, A., J.C. Weber, C. Sotelo Montes, H. Vidaurre, B. Vosman & M. J. M. Smulders. 2004. Genetic differentiation and trade among populations of peach palm (*Bactris gasipaes* Kunth) in the Peruvian Amazon—implications for genetic resource management. *Theoretical and Applied Genetics* 108: 1564-1573.
- Akkaya, M. S., A. A. Bhagwat & P. B. Cregan. 1992. Length polymorphisms of simple sequence repeat DNA in soybean. *Genetics* 132: 1131-1139.
- Bacon, C. D. & C. D. Bailey. 2006. Taxonomy and conservation: a case study from *Chamaedorea alternans*. *Annals of Botany* 98: 755-763.
- Balick, M. & S.N. Gershoff. 1981. Nutritional evaluation of the *Jessenia bataua* palm: Source of high quality protein and oil from Tropical America. *Economic Botany* 35: 261-271.
- Barbará, T., C. Palma-Silva, G. Paggi, F. Bered, M. F. Fay & C. Lexer. 2007. Cross-species transfer of nuclear microsatellite markers: potential and limitations. *Molecular Ecology* 16: 3759-3767.
- Belkhir, K., P. Borsa, L. Chikhi, N. Raufaste & F. Bonhomme. 2000. Genetix v. 4.02, logiciel sous Windows pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II, Montpellier.
- Billote, N., A. M. Risterucci, E. Barcelos, J. L. Noyer, P. Amblard & F. C. Baurens.

2001. Development, characterization, and across-taxa utility of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) microsatellite markers. *Genome* 44: 413-425.
- Billotte, N., T. Couvreur, N. Marseillac, P. Brottier, B. Perthuis, M. Vallejo, J.L. Noyer, J.P. Jacquemoud-Collet, A. M. Risterucci & J.C. Pintaud. 2004a. A new set of microsatellite markers for the peach palm (*Bactris gasipaes* Kunth); characterization and across-taxa utility within the tribe Cocoeae. *Molecular Ecology Notes* 4: 580-582.
- Billotte, N., N. Marseillac, P. Brottier, J.-L. Noyer, J.-P. Jacquemoud-Collet, C. Moreau, T. Couvreur, M.H. Chevallier, J.C. Pintaud & A. M. Risterucci. 2004b. Nuclear microsatellite markers for the date palm (*Phoenix dactylifera* L.): characterization and utility across the genus *Phoenix* and in other palm genera. *Molecular Ecology Notes* 4: 256-258.
- Busby, J. R. 1991. BIOCLIM – a bioclimate analysis and prediction system. pp. 64-68. En: Margules, C. R. & M. P. Austin (eds.) *Nature Conservation: Cost Effective Biological Surveys and Data Analysis*. CSIRO, Melbourne.
- Cardoso, S.R.S., N.B. Eloy, J. Provan, M.A. Cardoso & C.G. Ferreira. 2000. Genetic differentiation of *Euterpe edulis* Mart. Populations estimated by AFLP analysis. *Molecular Ecology* 9: 1753-1760.
- Choo, J., H. Isaac, B. Simpson, U. Mueller & T. Juenger. 2010. Characterization of 14 microsatellite loci in a tropical palm, *Attalea phalerata* (Arecaceae). *American Journal of Botany* 97:105-106.
- Cibrián-Jaramillo A., W.J. Hahn & R. Desalle. 2008. Development of microsatellite markers of the Mexican understory palm *Chamaedorea elegans*, cross-species genotyping, and amplification in congeners. *Molecular Ecology Resources*: 8: 322-324.
- Cibrián-Jaramillo, A., C. D. Bacon, N. C. Garwood, R. M. Bateman, M. M. Thomas, S. Russell, C. D. Bailey, W. J. Hahn, S.G. Bridgewater & R. DeSalle. 2009. Population genetics of the understory fishtail palm *Chamaedorea ernesti-augusti* in Belize: high genetic connectivity with local differentiation. *BMC Genetics* 10: 65.
- Cole, D. M., T. L. White & P. K. R. Nair. 2007. Maintaining genetic resources of peach palm (*Bactris gasipaes* Kunth): The role of seed migration and swidden-fallow management in northeastern Peru. *Genetic Resources and Crop Evolution* 54:189-204.
- Conte, R., M. Sedrez dos Reis, A. Mantovani & R. Vencovsky. 2008. Genetic structure and mating system of *Euterpe edulis* Mart. Populations: A comparative analysis using microsatellite and allozyme markers. *Journal of Heredity* 99: 476-482.
- Conte, R., R.O. Nodari, R. Vencovsky & M. Sedrez dos Reis. 2003. Genetic diversity and recruitment of the tropical palm, *Euterpe edulis* Mart. in a natural population from the Brazilian Atlantic Forest. *Heredity* 91: 401-406.
- Couvreur T.L.P., N. Billotte, A.-M. Risterucci, C. Lara, Y. Vigouroux, B. Ludeña, J.-L. Pham & J.-C. Pintaud. 2006. Close genetic proximity between cultivated and wild *Bactris gasipaes* Kunth revealed by microsatellite markers in Western Ecuador. *Genetic Resources and Crop Evolution* 53: 1361-1373.
- Crawford, N. G. 2010. SMOGD: software for the measurement of genetic diversity. *Molecular Ecology Resources* 10: 556-557.
- Doyle, J.J. & J.L. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19: 11-15.
- Dransfield, J., N.W. Uhl, C.B. Asmussen, W.J. Baker, M.M. Harley & C.E. Lewis. 2008. *Genera palmarum: The evolution and classification of palms*. 2da. Edic., Kew Publishing, Royal Botanical Gardens, Kew. 732 p.

- Eguiarte, L. E., N. Perez-Nasser & D. Piñero. 1992. Genetic structure, outcrossing rate and heterosis in *Astrocaryum mexicanum* (tropical palm): implications for evolution and conservation. *Heredity* 69: 217-228.
- Gaiotto, F. A., D. Grattapaglia & R. Vencovsky. 2003. Genetic structure, mating system, and long-distance gene flow in heart of palm (*Euterpe edulis* Mart.). *Journal of Heredity* 94: 399-406.
- Gaiotto, F. A., R. P. V. Brondani & D. Grattapaglia. 2001. Microsatellite markers for heart of palm – *Euterpe edulis* and *E. oleracea* Mart. (Arecaceae). *Molecular Ecology Notes* 1: 86-88.
- Gaitan, E. 2003. Obtención y uso de secuencias microsatélites GA/CA en estudios de diversidad genética en las especies de palmas colombianas *Ceroxylon sasaimae*, *Ceroxylon alpinum* y *Attalea amygdalina*. Tesis doctoral en Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. 157 p.
- Guillot, G., F. Mortier & A. Estoup. 2005. Geneland: a program for landscape genetics. *Molecular Ecology Notes* 5: 712-715.
- Hamilton, M. B. 1999. Tropical tree gene flow and seed dispersal. *Nature* 401: 129-130.
- Hartl, D. L. & E. W. Jones. 2009. Genetics. Analysis of genes and genomes. 7ma. Edic., Jones & Bartlett Publishers, Sudbury. 763 p.
- Hernández, J. A., J. Mora & O. Rocha. 2008. Diversidad genética y relaciones de parentesco de las poblaciones silvestres y cultivadas de pejibaye (*Bactris gasipaes*, Palmae), utilizando marcadores microsatelitales. *Revista de Biología Tropical* 56(1): 217-245.
- Jones, C. J., K. Edward, S. Castaglione, M. Winfield, F. Sala, C. van de Wiel, G. Bredemeijer, B. Vosman, M. Matthes, A. Daly, R. Bretschneider, P. Bettini, M. Buiatti, E. Maestri, A. Malcevski, N. Marmioli, R. Aert, G. Volckaert, J. Rueda, R. Linacero, A. Vazquez & A. Karp. 1997. Reproducibility testing of RAPD, AFLP and SSR markers in plants by a network of European laboratories. *Molecular Breeding* 3: 381-390.
- Karubian J., V. Sork, V. L. Sork, R. Duares & T. B. Smith. 2010. Destination-based seed dispersal homogenizes genetic structure of a tropical palm. *Molecular Ecology* 19: 1745-1753.
- Leberg, P. L. 2002. Estimating allelic richness: Effects of sample size and bottlenecks. *Molecular Ecology* 11: 2445-2449.
- Lepsch-Cunha N., C.A. Lund & M.B. Hamilton. 2003. Isolation and characterization of nuclear microsatellite loci in the tropical arboreal palm *Oenocarpus bacaba* (Arecaceae). *Molecular Ecology Notes* 3: 435-437.
- Luna, R., B. K. Epperson & K. Oyama. 2005. Spatial genetic structure of two sympatric Neotropical palms with contrasting life histories. *Heredity* 95: 298-305.
- Luna, R., B. K. Epperson & K. Oyama. 2007. High levels of genetic variability and inbreeding in two Neotropical dioecious palms with contrasting life histories. *Heredity* 99: 466-476.
- Montúfar, R. 2007. Structure génétique, biochimique, morphologique et écologique de *Oenocarpus bataua* Mart. (Arecaceae): perspectives pour la valorisation durable d'une ressource forestière néotropicale. Tesis doctoral en biología integrativa, École Nationale Supérieure Agronomique de Montpellier, Montpellier. 108 p.
- Montúfar, R., C. Mariac, J. L. Pham & J. C. Pinaud. 2007. Isolation of 23 polymorphic microsatellite loci in the Neotropical palm *Oenocarpus bataua* Martius (Arecaceae). *Molecular Ecology Notes* 7: 75-78.
- Montúfar, R., A. Laffargue, J-C. Pinaud, S. Hamon, S. Avallone & S. Dussert. 2010. *Oenocarpus bataua* Mart. (Arecaceae): rediscovering a source of high oleic vegetable oil from Amazonia. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 87: 167-172.

- Moretzsohn, M. C., M. A. Ferreira, Z. P. S. Amaral, P. J. A. Coelho, D. Grattapaglia & M. E. Ferreira. Genetic diversity of Brazilian oil palm (*Elaeis oleifera* H.B.K.) germplasm collected in the Amazon forest. *Euphytica* 124(1): 35-45.
- Nucci, S. M., J. A. Azevedo-Filho, C. A. Colombo, R. H. G. Priolli, R. M. Coelho, T. L. Mata & M. I. Zucchi. 2008. Development and characterization of microsatellites markers from the *macaw*. *Molecular Ecology Resources* 8: 224-226.
- Nybom, H. 2004. Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. *Molecular Ecology* 13: 1143-1155.
- Peakall, R. & P. E. Smouse. 2006. Genalex 6: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6: 288-295.
- Perera, L., Russell, J. R., Provan & W. Powell. 1999. Identification and characterization of microsatellites in coconut (*Cocos nucifera* L.) and the analysis of coconut populations in Sri Lanka. *Molecular Ecology* 8(2): 344-346.
- Pritchard, J. K., M. Stephens & P. Donnelly. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945-959.
- Pruett, C. & K. Winker. 2008. The effects of sample size on population genetic diversity estimates in song sparrows *Melospiza melodia*. *Journal of Avian Biology* 39: 252-256.
- Raymond, M. & F. Rousset. 1995. Genepop (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity* 86: 248-249.
- Rivera, R., K. J. Edwards, J. H. Barker, G. M. Arnold, G. Ayad, T. Hodgkin & A. Karp. 1999. Isolation and characterization of polymorphic microsatellites in *Cocos nucifera* L. *Genome* 42(4): 668-75.
- Roncal, J., J. Francisco-Ortega & C.E. Lewis. 2007. An evaluation of the taxonomic distinctness of two *Geonoma macrostachys* (Arecaceae) varieties based on intersimple sequence repeat (ISSR) variation. *Botanical Journal of the Linnean Society* 153: 381-392.
- Sawazaki, H. E., M. L. A. Bovi, L. Sodek & C. A. Colombo. 1998. Diversidade genética em palmeiras a través de isoenzimas e RAPD. *Revista Brasileira de Biología* 58(4):681-691.
- Schaberg, P. G., D. DeHayes, G. Hawley & S. E. Nijensohn. 2008. Anthropogenic alterations of genetic diversity within tree populations: Implications for forest ecosystem resilience. *Forest Ecology and Management* 256: 855-862.
- Schneider, S., L. Excoffier & G. Laval. 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1:47-50.
- Sezen, U.U., R.L. Chazdon & K.E. Holsinger. 2007. Multigenerational genetic analysis of tropical secondary regeneration in a canopy palm. *Ecology* 88: 3065-3075.
- Squirrel, J., P.M. Hollingsworth, M. Woodhead, J. Russell, J. Lowe, M. Gibby & W. Powell. 2003. How much effort is required to isolate nuclear microsatellites from plants? *Molecular Ecology* 12: 1339-1348.
- Trénel, P., M. Hansen, S. Normand & F. Borchsenius. 2008. Landscape genetics, historical isolation and cross-Andean gene flow in the wax palm, *Ceroxylon echinulatum* (Arecaceae). *Molecular Ecology* 17: 3528-3540.

Artículo recibido en: Septiembre de 2010.

Manejado por: Mónica Moraes R.

Aceptado en: Noviembre de 2010.

**Anexo 1.** Información de microsatélites (SSRs) utilizados en el proyecto PALMS. Se describe 17 marcadores SSRs aislados de *Oenocarpus bataua*, 12 marcadores transferidos a *Euterpe precatoria*, 12 marcadores transferidos a *Prestoea acuminata* y 7 marcadores transferidos a *Ceroxylon echinulatum*. Leyenda: 1) Marcador amplificado o transferido a: Ob = *O. bataua*, Ep = *E. precatoria*, Pa = *P. acuminata*, Ce = *C. echinulatum*; 2) Autor: a = Montúfar *et al.* 2007; b = Gaiotto *et al.* 2001; c = Lepsch-Cunha *et al.* 2003; d = Gaitán 2003.

Locus SSRs	Motivo	Secuencia de los cebadores	Tamaño (bp)	Amplificado o transferido a: (1)	Autor
OB01	(GA) <sub>17</sub>	F: TTTGAGTTCCCCAAATCTAATACA R: GGATGAGAGGCAAGGCATAA	180-220	Ob, Ep, Pa	a
OB02	(GA) <sub>20</sub> (CA) <sub>10</sub>	F: CTGAACCTTATCCCAACTGA R: CACATAACTTTTCAGGCACA	128-153	Ob,	a
OB03	(GA) <sub>14</sub>	F: ATTGTTTCCAGTCATCATCC R: TTGCAAGACAATTTCTGAGA	110-133	Ob	a
OB04	(GA) <sub>17</sub>	F: CCATATACGGGCAAATTAAG R: CATGTGAACACGCTAGGAG	145-190	Ob	a
OB05	(GA) <sub>15</sub>	F: GGATTCTATGAGAACATACCC R: GAGGTAGGCTAGGCCTAAAG	160-190	Ob	a
OB06	(GA) <sub>17</sub>	F: GGATTGCATGTGTTTCATTTA R: TTACGCAATGTTTTATTGG	200-235	Ob	a
OB07	(GA) <sub>13</sub>	F: ATGGCAGTGCTTTGATATTC R: TTTAATGGAGGGTTTGATTG	180-213	Ob, Pa	a
OB08	(GA) <sub>15</sub> GG(T) <sub>24</sub>	F: GAGGAGGAATTCTTTCCATT R: AGCCATTAATAATTCATGCAC	206-230	Ob, Pa	a
OB09	(GA) <sub>14</sub>	F: AGTCCGTAACAGGATCAA R: GGATGGATCCTTCTTCTCAT	178-193	Ob	a
OB10	(GA) <sub>19</sub>	F: GCCTTCTTCCCTATCT R: TCCAAGATACCGAATCTCAC	153-193	Ob	a
OB11	(GA) <sub>14</sub>	F: ATGAGGGATGTCAATGGAT R: AAAATTCTCCTCTCGCTCTT	145-185	Ob	a
OB13	(GA) <sub>18</sub>	F: CCTATCCCCCTGAACTCTAT R: GAGTTGGTGAAGGACTCAGA	170-208	Ob	a
OB14	(GA) <sub>13</sub>	F: TGGCATTCTTGACTTTGCAT R: ACCATGCCAACTGTGACCTT	160-178	Ob	a
OB17	(GA) <sub>16</sub>	F: TAGCTTTAGAGCGAGGGACT R: TGAGCCATAGAAGTACCTT	140-160	Ob, Ep, Pa	a
OB18	(GA) <sub>18</sub>	F: GCTCCAGCTTCCAAGATAC R: ACAAGTGACTGTTCTCACC	128-160	Ob	a
OB19	(GA) <sub>18</sub>	F: CCGAATCTCACCTAAACAAG R: CACCACCTAACACTTTCTTTG	193/233	Ob, Pa	a
OB21	(GA) <sub>9</sub> -(GA) <sub>16</sub>	F: AGAGTGCTAGGGGTGCTCAT R: TGAAATGGTTGATGAATTGAATG	213/245	Ob, Pa	a
EE3	(AG) <sub>11</sub> -(AG) <sub>16</sub>	F: TTCGCGCACACTGAGAG R: GGTAGCGTTGATTGGTCC	190-200	Ep, Pa	b

Estructuración genética de poblaciones de palmeras en el neotrópico derivado de marcadores microsatélites (SSRs)

Locus SSRs	Motivo	Secuencia de los cebadores	Tamaño (bp)	Amplificado o transferido a: (1)	Autor
EE15	(AG) <sub>21</sub>	F: CCACACAGACACGCAGATAG R: CCTCATGAAGCATCGACCT	140-160	Ep, Pa	b
EE48	(AG) <sub>27</sub>	F: CCTACCATTACGTACTGTCTG R: CAATATCAAGCTCATCCATC	210-266	Ep	b
EE52	(AG) <sub>22</sub>	F: TTCTGTGGAGAGTCAATCATC R: AATCTGACAAGGCCTCAAC	230-260	Ep	b
EE54	(AG) <sub>25</sub>	F: CATGTATCTAAGGAACAAGG R: CTGTGCTCTCTCATTCTCA	140-160	Ep	b
EE59	(AG) <sub>16</sub>	F: AACCTCTCTTTGGCCTA R: CTTGGCATACTGGAACC	84-128	Ep	b
EE63	(AG) <sub>18</sub>	F: CCGATATGCTCAAATCAATG R: ACGAGAGGAATCAAAGAACC	106-132	Ep	b
AC5-3#4	CT/GT	F: ACTGTCTGCAGACAATCGAC R: CTTTTGACACCATTAGTCTGC	202-226	Ep, Pa	c
AG5-5#6	CT	F: CGGACCAGTGTGGGTGTAAG R: TGGCAGAAAGGAATCTATGCAG	139-153	Ep, Pa,	c
AG5-7#9	AG	F: ATGGTTAGTAGTTATGAGGC R: TCTTCATGGTAGATGGCTTG	269-297	Pa	c
AG5-5#1	GA	F: TGGTTATGAATCTTAGCCTC R: AAATCCATGCTCCATAGTCC	169-199	Ep, Pa,	c
Ca13	(GA) <sub>22</sub>	F: TTTGACCCTCCCTAGACCC R: ATCAGGAGCTAATGTTGACCC	230-240	Ce	d
Ca17	(GA) <sub>30</sub>	F: CAGACATTGGCTTCAAACA R: ATGCGCTTATTCTGTTCTC	112-116	Ce	d
Ca20	(GA) <sub>20</sub> (GA) <sub>29</sub>	F: GTATTCCAAGCCATTTC R: CAGAGAGATAGAAAACCAAAGC	130-158	Ce	d
Cs3	(AC) <sub>13</sub> (GA) <sub>32</sub>	F: GAATGTGACCATCTGCTA R: AAATGTAGAGGAATTGCAT	145-164	Ce	d
Cs5	(TG) <sub>6</sub> (GT) <sub>4</sub>	F: GCATTGTGAGAGCAAGTGC R: GAAACCACCAATCCTCCTT	200-210	Ce	d
Cs24	(CA) <sub>20</sub> (GA) <sub>5</sub>	F: CGTGTCTTCACCAGAGTGTCTG R: ACCGTCGTTTCATGGCACCA	185-215	Ce	d
Cs30	(GA) <sub>15</sub>	F: GTGCGCCACATGGAACCTAA R: CGAAGCCATCTGCATGGA	234-248	Ce	d