

00376



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de Ciencias
División de Estudios de Posgrado

6
Zep.

**Variación genética y biología reproductiva de
Chamaedorea alternans mediante el uso de los
marcadores moleculares (RAPDs) en la selva de
"Los Tuxtlas", Veracruz, México.**

T E S I S

Que para obtener el grado académico de
**MAESTRIA EN CIENCIAS (ECOLOGIA
Y CIENCIAS AMBIENTALES)**

P r e s e n t a :

BIOL. MARTA ADRIANA OTERO ARNAIZ



Director de Tesis:

Ken Alberto Oyama Nakagawa

México, D. F.

263792 1998

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Indice

Resumen

Abstract

Introducción general	2
Historia natural de <i>Chamaedorea alternans</i>	6
Referencias	10
Capítulo 1. El uso de los RAPDs como marcadores moleculares en plantas	
Resumen	13
Abstract	13
Los RAPDs como marcadores moleculares	14
Identificación genética	17
Genética de poblaciones	20
Hibridización interespecífica	21
Identificación de relaciones genéticas de cultivares y variedades	21
Análisis filogenético	21
Biología de la conservación	23
Métodos de análisis	25
Ventajas y desventajas de los RAPDs como marcadores moleculares	26
Comentarios finales y perspectivas	31
Literatura citada	31
Capítulo 2. Polinización y fenología reproductiva de <i>Chamaedorea alternans</i> H.A. Wendl. en la selva de Los Tuxtlas, Veracruz	
Resumen	45
Introducción	46
Objetivos	50
Sitio de estudio	51
Métodos	53
Polinización	53
Fenología reproductiva	54
Resultados	56
Polinización	56
Fenología reproductiva	56
Discusión	63
Polinización	63
Fenología reproductiva	63
Rendimiento de frutos	64
Referencias	67

Capítulo 3. Variación genética de *Chamaedorea alternans* H. A. Wendl. y su relación con algunos parámetros demográficos en la selva tropical de Los Tuxtlas, Veracruz.

Resumen	71
Introducción	72
Objetivos	77
Sitio y sistema de estudio	77
Métodos	78
Trabajo de campo	78
Trabajo de laboratorio	79
Resultados	86
Variación genética de la población	87
Estructura de la población	88
Discusión	94
Variación genética de la población	94
Estructura de la población	96
Identificación genética	97
Literatura citada	99
Discusión y conclusiones generales	107

Resumen

Se presenta una revisión de las principales aplicaciones de los marcadores moleculares denominados RAPDs. Se discute la utilidad de estos marcadores y se describen brevemente los métodos de análisis que se han empleado para estudios de variación genética. A la luz de esta revisión y de su aplicación en un estudio poblacional se confirma la utilidad de estos marcadores en estudios a nivel infraespecífico.

Se estudiaron aspectos de la biología reproductiva y los niveles de variación y estructura genética de una población de *C. alternans* mediante los RAPDs y su relación con algunos parámetros demográficos en la selva de Los Tuxtlas, Veracruz durante el evento reproductivo de 1995-1996. Con los resultados de esta investigación se proponen estrategias de manejo y conservación para la población. Por otro lado, la generación de esta información básica permitirá establecer las relaciones de parentesco dentro de la población y hacer inferencias sobre el flujo génico vía polen.

Abstract

In this work a review of the principal applications of the molecular markers RAPDs is presented. The utility of this markers is discussed and the methods of analyses used to estimate genetic variation are briefly described. This review and the application of the RAPDs in a population study confirm the utility of this markers in studies to infraspecific nivel.

Aspects of the reproductive biology and genetic structure of *Chamaedorea alternans* population in "Los Tuxtlas" forest have been analysed, through RAPDs ; also the relation of these aspects with demographic parameters were analysing during the reproductive period of 1995-1996. The results of this research proposed conservation and management strategies to the population. This basic information will be used to establish the population relativeness and it will make inferences of the polen gene flow.

INTRODUCCIÓN GENERAL

Introducción general

Las comunidades tropicales presentan una gran diversidad de especies. Raven (1976, en Mooney, 1988) estimó que el 65% de las 250,000 o más especies de plantas del planeta se encuentran en regiones tropicales. No obstante, la deforestación de los bosques húmedos tropicales ha aumentado considerablemente en los últimos años, representando un grave problema debido a sus efectos negativos visibles en aspectos tan importantes como cambios climáticos, pérdida de la biodiversidad y alteraciones drásticas del hábitat. De continuar las mismas tendencias en el manejo de la tierra este proceso de degradación del paisaje que está ocurriendo actualmente en varias regiones tropicales podría ser más común en el futuro (Uhl *et al.*, 1982; Toledo, 1988; Nepstad *et al.*, 1991), lo cual hace urgente la necesidad de estrategias de manejo y conservación de estas comunidades más eficientes.

Los estudios de la variación genética en poblaciones vegetales han revelado que ésta no se distribuye al azar y que los niveles y estructura de esta variación son afectados por el sistema de apareamiento, el flujo génico y la selección (Howe *et al.*, 1985 ; Hamrick y Loveless, 1986 ; Hamrick, 1990 ; Hamrick *et al.*, 1992 y Loveless, 1992). En cuanto a los estudios en plantas tropicales los patrones que se han detectado son que los niveles de variación son mayores que en plantas templadas y que gran parte de esta variación se presenta a nivel intrapoblacional (Loveless, 1992). En las plantas tropicales la

tasa de entrecruzamiento por lo general es mayor al 0.80 ; de 22 especies estudiadas sólo en tres se ha observado una tasa menor (Murawski et al., 1990 ; Murawski y Hamrick, 1991; Murawski et al., 1994). Estos patrones apoyan la hipótesis de que la alta diversidad biológica en los trópicos es el resultado de la adaptación de las poblaciones a nichos específicos definidos por componentes bióticos y abióticos (Hubbell, 1979 ; Bawa, 1990).

El conocimiento del sistema de apareamiento, flujo génico y estructura de la población no sólo tiene implicaciones teóricas, sino que también tiene implicaciones obvias en el establecimiento de estrategias de manejo y conservación. La remoción selectiva de individuos de una población puede alterar los patrones de apareamiento con consecuencias desconocidas sobre la variación genética de los frutos producidos. Si las poblaciones presentan una estructura genética a una escala local, los vecinos estarán más relacionados entre ellos que con individuos más alejados. En este caso la remoción de individuos reducirá los apareamientos entre consanguíneos y aumentará el entrecruzamiento. Pero si la remoción selectiva de individuos incrementa la distancia entre conspecíficos a una extensión mayor que el flujo génico de polen, esta remoción resultara en una baja fecundidad (Bawa y Krugman, 1991). Por otro lado, si las especies se presentan en su hábitat natural como poblaciones pequeñas con endogamia, y con elevada diferenciación entre las poblaciones; entonces una especie podría conservarse con una colección de individuos de cada una de sus poblaciones. Si por el

contrario, las especies presentan tamaños efectivos poblacionales altos, bajos niveles de endogamia, y la diferenciación entre poblaciones es baja, entonces el conservar poblaciones pequeñas sería imposible debido a los efectos deletéreos de la depresión por endogamia y deriva génica (Eguiarte y Piñero, 1990).

Por otro lado, para entender el desarrollo de la estructura genética de una población es de particular importancia la evaluación del sistema de apareamiento y de los patrones de movimiento del polen y semillas. El sistema de apareamiento está dado por los patrones de parentesco dentro de una población que determinan la composición genotípica de la progenie, mientras que la distancia de dispersión (polen y semillas) determina la escala espacial a la cual estas partes del ciclo de vida tienen influencia sobre la estructura genética (Nason *et al.*, 1997). La generación de información acerca del mecanismo de polinización y fenología floral es de fundamental importancia para el establecimiento de los patrones de apareamiento dentro de una población y por lo tanto del movimiento de polen.

En este trabajo se estudia la biología reproductiva, polinización y niveles de variación genética, así como su relación con parámetros demográficos de una palma tropical. Con base en estos datos se podrán proponer estrategias de conservación para esta población.

En la primera parte de este trabajo se presenta una revisión del uso de un tipo de marcador molecular (RAPDs) en el estudio de diferentes aspectos de la biología vegetal. Se presenta el principio básico de este marcador y las ventajas y desventajas de éste sobre otros tipos de marcadores para diferentes casos de estudio. En la segunda parte del trabajo se presenta el estudio de algunos aspectos de la biología reproductiva de *Ch. alternans*, la fenología floral, el mecanismo de polinización y se discute sobre los factores que pueden estar limitando el rendimiento de frutos. En la tercera y última parte se presentan los niveles y estructura genética de esta población y su relación con algunos parámetros demográficos. La generación de esta información básica permitirá establecer posteriormente las relaciones de parentesco dentro de la población y hacer inferencias sobre el flujo génico vía polen.

Historia natural de *Chamaedorea alternans*.

Chamaedorea alternans, como todas las especies de este género es una palma dioica. Dentro del género existen aproximadamente 100 especies distribuidas desde la parte central de México hasta Brasil y Bolivia (Hodel, 1992). Esta especie es endémica de México, específicamente de Veracruz (Roulet, 1992).

En la selva de Los Tuxtlas, *Ch. alternans* es una de las especies más abundantes del sotobosque (Oyama, 1987; Bongers *et al.*, 1988; Ibarra-Manríquez *et al.*, 1997), con densidades de 1,097 individuos/ha (Bongers *et al.*, 1988). Se han llevado a cabo una serie de trabajos ecológicos de esta especie siguiendo la identificación taxonómica con base en Ibarra-Manríquez (1988; *cf Ch. tepejilote*). Sin embargo, un estudio taxonómico posterior considera a *Ch. tepejilote* como *Ch. alternans*. (G. Ibarra-Manríquez y D.R. Hodel, com. pers.).

El tallo de los individuos más altos puede alcanzar alturas de 5m, con tres a siete hojas alternas y raíces fulcrantes que contribuyen al sostén de las palmas en pie (Oyama, 1984). Las flores son de color verde amarillento, poco atractivas. Los machos presentan más flores por inflorescencia que las hembras (Oyama, 1987; 1990). La producción de inflorescencias por individuo varía tanto espacial como temporalmente, tal vez debido a un patrón

diferencial en la asignación de recursos (Oyama y Dirzo, 1988) o a la influencia de la heterogeneidad ambiental.

Se ha reportado que esta especie en Los Tuxtlas se reproduce anualmente, floreciendo durante la época de nortes (septiembre a enero) y la fructificación se presenta en la segunda mitad de las lluvias y a veces se prolonga hasta enero (Carabias-Lillo y Guevara, 1985; Oyama, 1987). Se han observado coleópteros y thysanópteros en las inflorescencias de esta especie (Oyama, 1997), y se ha sugerido que las especies del género *Chamaedorea* pueden ser polinizadas por viento (Bawa y Crisp, 1980), aunque hasta la fecha no existe ningún estudio en el que se determine el mecanismo de polinización. Se presenta gran variación en la producción de frutos, que puede ser desde 5 hasta 400 (Oyama, 1987, 1990). Se ha reportado una relación entre el número de flores y frutos de aproximadamente 12%, relativamente baja en comparación con otras especies de los Tuxtlas (Oyama, 1987). Todos los frutos contienen una sola semilla cubierta por una pulpa carnosa.

Datos demográficos de esta especie indican que las semillas y plántulas son los estadios del ciclo de vida donde el riesgo de muerte es mayor. Las semillas son depredadas por la larva del curculiónido *Eugeraeus unifasciatus* Champion. La tasa de depredación es muy variable, pero en promedio son dañados el 60% de los frutos (Oyama, 1991). Los frutos de *Ch. alternans* son atractivos a diferentes especies de frugívoros. Si bien no se ha estudiado la

distancia de dispersión de las semillas, se han reportado observaciones que indican que algunas de las semillas podrían ser dispersadas a largas distancias dentro del sotobosque. Trejo-Pérez (1989) observó semillas viables de esta especie en el tracto digestivo de dos especies de aves: *Catharus minimus* y *Turdus assimilis*. Escalona (1989) encontró que *Ch. alternans* es dispersada por las aves *Hylocichla mustelina*, *Habia fuscicauda* y *Turdus assimilis* y posiblemente por murciélagos frugívoros (*Carollia brevicauda* v *Artibeus photis*).

Varios factores influyen en la mortalidad de las plántulas. El crecimiento de las plántulas depende en gran medida de las condiciones de luz que llega al sotobosque (del Amo, 1985). Por otro lado, las plántulas son arrastradas por corrientes de agua formadas después de intensas lluvias o son aplastadas por la caída de ramas del dosel (Oyama, 1987).

La mortalidad de los adultos se debe principalmente a la caída de ramas del dosel de la selva, que pueden romper el meristemo apical, produciendo la muerte de las palmas (Oyama, 1987; 1990). El escarabajo *Calyptocephala marginipennis* Bohem. daña las hojas jóvenes de *Ch. alternans*, lo cual aparentemente no se traduce en un efecto negativo sobre el crecimiento o la reproducción (Oyama, 1984; Oyama y Dirzo, 1991). Experimentos de defoliación mostraron que *Ch. alternans* no sufre consecuencias inmediatas en la producción de hojas e inflorescencias cuando la defoliación es del 50%. No

obstante, la formación de frutos disminuyó al segundo año después de la defoliación, sugiriendo la existencia de un efecto acumulativo negativo de la remoción foliar (Oyama y Mendoza, 1990). La edad y el tamaño (altura del tallo) se correlacionan entre sí y la longevidad estimada para *Ch. alternans* es de aproximadamente 50 años (Oyama, 1987, 1993).

Ch. alternans ha sido considerada como una especie de importancia económica (Ibarra-Manríquez *et al.*, 1997b). Tradicionalmente las palmas de esta especie han sido utilizadas por las comunidades locales en muy diversas formas; p. ej., se emplean las inflorescencias inmaduras como alimento (palmito); las hojas se utilizan como ornato en las iglesias o casas durante diferentes festividades. Por otro lado, las palmas de *Ch. alternans* al igual que otras especies de *Chamaedorea*, son explotadas de manera irracional por compañías relacionadas con la industria de la floricultura (Oyama, 1992). La necesidad de proteger y manejar este recurso natural es prioritaria (Oyama, 1997).

Referencias

- Bawa, K.S., P.S. Ashton y S.M. Nor. 1990. Reproductive ecology of tropical forest plants : Management issues. *En: Bawa, K.S. y M. Handley (eds.) Reproductive Ecology of Tropical Forest Plants*. UNESCO, Paris. pp. 3-13
- Bawa, K.S. y J.E. Crisp. 1980. Wind pollination in the understory of a rain forest in Costa Rica. *Journal of Ecology* 68:871-876.
- Bawa, K.S. y S.L. Krugman. 1991. Reproductive Biology and Genetics of Tropical Trees in Relation to Conservation and Management. *En: Rain Forest Regeneration and Management. Man and the Biosphere Series*. Vol. 6. UNESCO. Paris. pp. 119-133.
- Bongers, F., J. Popma, J. Meave y J. Carabias. 1988. Structure and floristic composition of the lowland rain forest of Los Tuxtlas, Mexico. *Vegetatio* 74:55-80.
- Carabias-Lillo, J. y S. Guevara S. 1985. Fenología de una selva tropical húmeda y en una comunidad derivada; Los Tuxtlas, Veracruz. *En: Gómez-Pompa A. y S. del Amo (eds.) Investigaciones sobre la regeneración de selvas altas en Veracruz, México*. Vol. II. INIREB y Alhambra. México. pp 27-66.
- del Amo R., S. 1985. Algunos aspectos de la influencia de la luz sobre el crecimiento de estados juveniles de las especies primarias. *En: A. Gómez-Pompa y S. del Amo R. (eds.) Investigaciones sobre la regeneración de selvas altas en Veracruz, México*. Vol. 2. Ed. Alhambra, México. pp 79-91.
- Eguiarte, L.E., N. Pérez-Nasser y D. Piñero. 1992. Genetic structure, outcrossing rate and heterosis in *Astrocaryum mexicanum* (tropical palm) : implications for evolution and conservation. *Heredity* 69:217-228.
- Eguiarte, L.E. y D. Piñero. 1990. Genética de la conservación: leones vemos, genes no sabemos. *Ciencias* Número especial 4:34-47.
- Escalona S.,E. 1989. Aspectos de la dispersión de semillas de *Chamaedorea tepelilote* (Palmae). Tesis de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. México.

- Hodel, D.R. 1992. *Chamaedorea palms. The species and their cultivation*. Allen Press, Lawrence, Kansas.
- Ibarra-Manríquez, G. 1988. The palms of a tropical rain forest in Veracruz, México. *Principes* 32:147-155.
- Ibarra-Manríquez, G., M. Martínez-Ramos, R. Dirzo y J. Nuñez-Farfán. 1997a. La vegetación de Los Tuxtlas: ecología y conservación. En: E. González S., R.C. Vogt y R. Dirzo (eds.). *La Historia Natural de Los Tuxtlas*. Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- Uhl, C., C. Jordan, K. Clark, H. Clark y R. Herrera. 1982. Ecosystem recovery in Amazon Caatinga forest after cutting, cutting and burring, and bulldozer clearing treatments. *Oikos* 38:313-320.
- Mooney, H.A. 1988. Lessons from Mediterranean-climate regions. En: Wilson, E.O. (ed.) *Biodiversity*. National Academic Press. Washington. pp. 157-165.
- Nason, J.D., P.R. Aldrich y J.L. Hamrick. 1997. Dispersal and the dynamics of genetic structure in fragmented tropical tree populations. En: Laurance, W.F. y R.O. Bierregaard Jr. (eds.) *Tropical Forest Remnants*. The University of Chicago Press, Chicago. pp. 304-320.
- Nepstad, D., C. Uhl y E. Adilson-Serrao. 1991. Surmounting barriers to forest regeneration in abandoned, highly degraded pastures: a case study from Paragominas, Para, Brazil. En: Anderson, A. (ed.) *Alternatives to Deforestation in the Amazon*. pp 215-219.
- Oyama, K. 1984. Biología comparativa entre individuos masculinos y femeninos de *Chamaedorea tepejilote* (Palmae). Tesis de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. México.
- Oyama, K. 1987. Demografía y dinámica poblacional de *Chamaedorea tepejilote* Liebm. (Palmae) en la selva de Los Tuxtlas, Veracruz (México). Tesis de Maestría en Ciencias. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. México.
- Oyama, K. 1990. Variation in growth and reproduction in the Neotropical dioecious palm *Chamaedorea tepejilote*. *Journal of Ecology* 78:648-663.
- Oyama, K. 1991. Seed predation by a curculionid beetle on the dioecious palm *Chamaedorea tepejilote*. *Principes* 35:156-160.

- Oyama, K. 1992. Conservation and exploitation of tropical resources: the case of *Chamaedorea* palms. *Evolutionary Trends in Plants* 6: 17-20.
- Oyama, K. 1993. Are age and height correlated in *Chamaedorea tepejilote* (Palmae). *Journal of Tropical Ecology* 9:381-385.
- Oyama, K. 1997. *Chamaedorea tepejilote*. En: González-Soriano, E., R. Dirzo y R.C. Vogt (eds.) *Historia Natural de Los Tuxtlas*. Universidad Nacional Autónoma de México, México. pp:107-109.
- Oyama, K. y A. Mendoza. 1990. Effects of defoliation on growth, reproduction and survival of a neotropical dioecious palm *Chamaedorea tepejilote*. *Biotropica* 22:119-123.
- Oyama, K. y R. Dirzo. 1988. Biomass allocation in the dioecious tropical palm *Chamaedorea tepejilote* and its life history consequences. *Plant Species Biology* 3: 27-33.
- Oyama, K. y R. Dirzo. 1991. Ecological aspects of the interaction between *Chamaedorea tepejilote*, a dioecious palm and *Calyptocephala marginipennis*, a herbivorous beetle, in a Mexican rain forest. *Principes* 35:86-93.
- Raven, P.H. 1976. Ethics and attitudes. En: Simmons, J.B., R.I. Beyer, P.E. Brandham, G. Lucas y V.T.H. Parry (Eds.). *Conservation of Threatened Plants*. Plenum. N.Y. pp. 155-181.
- Toledo, V.M. 1988. La diversidad biológica de México. *Ciencia y Desarrollo* 81:17-30.
- Trejo-Pérez, L. 1989. Diseminación de semillas por aves en Los Tuxtlas, Ver. En: A. Gómez-Pompa, S. del Amo R., C. Vázquez-Yanes y A. Butanda (eds.). *Regeneración de selvas*. Ed. Continental, México. pp 447-470.

CAPÍTULO 1.

EL USO DE LOS RAPDs COMO MARCADORES MOLECULARES EN PLANTAS

(Publicado en el Boletín de la Sociedad Botánica de México 60: 85-117, 1997)

EL USO DE LOS RAPDS COMO MARCADORES MOLECULARES EN PLANTAS

ADRIANA OTERO ARNAIZ, MARLENE DE LA CRUZ Y KEN OYAMA

Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México,
Apartado Postal 70-275, Ciudad Universitaria, 04510 México D.F., México.

Resumen. Se presenta una revisión de los marcadores moleculares denominados RAPDs (pronunciado "rapids"; de su nombre en inglés: Random Amplified Polymorphic DNA; su traducción al español: Polimorfismos de ADN Amplificados al Azar). Se presentan sus principales aplicaciones en estudios de mapeo genético, identificación de características de interés, genética de poblaciones, identificación, variación genética intra e inter-específica, filogenias y biología de la conservación. Se ha demostrado, en general, que los RAPDs como marcadores moleculares son útiles en problemas de estimación de la diversidad genética, identificación de taxa, clones, variedades e híbridos. Sin embargo, se ha cuestionado su uso en sistemática en la resolución de relaciones filogenéticas principalmente por las dificultades en las determinaciones de la identidad, homología e independencia de los caracteres de interés. Se describen brevemente los métodos de análisis que se han empleado para estudios de variación genética. Al final se presentan algunos de los desarrollos recientes tanto en técnicas como métodos de análisis de marcadores basados en PCR.

Palabras clave: estructura genética, filogenias, marcadores moleculares, PCR, RAPDs.

Abstract. In this paper a review of RAPDs (Random Amplified Polymorphic DNA) as molecular markers is presented. This molecular marker has been used to genetic mapping, population genetic structure, genetic identification, intra and interspecific variation, reconstructing phylogenies and conservation biology. In general, RAPDs have been useful to estimate genetic diversity, genetic identification of taxa, clones, varieties and hybrids. However, their use in Systematic has been questioned due to the difficulties in the determination of identity, homologies and independence of characters. Methods of analyses used to estimate genetic diversity are briefly described. Finally, some recent advances and new technics based on PCR are presented.

Key words: molecular markers, PCR, phylogenies, population genetic structure, RAPDs.

Las estrategias clásicas para la detección de variación (anatomía, morfología, embriología y fisiología comparadas) han sido completadas con técnicas moleculares. Estas técnicas incluyen el análisis de los constituyentes químicos y la caracterización de macromoléculas. Los marcadores moleculares son una serie de métodos de análisis genético-moleculares que se basan en la detección de polimorfismos en proteínas y ADN, cuyos principios y técnicas se han utilizado para resolver problemas específicos en genética y ecología de poblaciones, evolución de sistemas reproductivos, mapeo genético de caracteres de interés agronómico, procesos de hibridación e introgresión, determinación de patrones biogeográficos, resolución e identificación de relaciones taxonómicas, reconstrucción de filogenias y biología de la conservación.

En los últimos años se han desarrollado las estrategias generales para la detección de polimorfismos moleculares como hibridación molecular, amplificación enzimática y secuenciación de ADN. Un ejemplo de esto es la introducción de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR; Polymerase Chain Reaction) (Saiki *et al.*, 1988; Erlich y Arnheim, 1992), un método *in vitro* de amplificación enzimática de segmentos específicos de ADN que ha simplificado el estudio de la variación genética y ha transformado la manera en que se llevan a cabo los análisis genéticos.

A principios de esta década, dos grupos de investigación independientes describieron simultáneamente una técnica para detectar niveles de polimorfismo. Por un lado, Williams *et al.* (1990) describieron aplicaciones de mapeo genético y denominaron al nuevo

método como RAPDs (de sus siglas en inglés Random Amplified Polymorphic DNA). Por otra parte, Welsh y McClelland (1990) se avocaron a realizar estudios de identificación ("fingerprinting") del genoma y denominaron a su ensayo AP-PCR (de sus siglas en inglés: Arbitrarily Polymorphisms-Polymerase Chain Reaction; su traducción al español: polimorfismos arbitrarios-PCR).

Los RAPDs son marcadores moleculares generados por la amplificación de segmentos aleatorios de ADN. La técnica es una variación de la reacción en cadena de la polimerasa. En esta reacción se amplifican segmentos de ADN. Para que se lleve a cabo la reacción se requiere del ADN que se desea amplificar, una enzima termoestable conocida como Taq (aislada de la bacteria *Thermus aquaticus*); magnesio como cofactor de la enzima; secuencias cortas de oligonucleótidos (e.g., 10 pares de bases) conocidas como "primers" y nucleótidos libres. La reacción de amplificación se lleva a cabo mediante cambios de temperatura. El ADN se desnaturaliza por calor a 94°C y al disminuir la temperatura (aproximadamente 37°C) el oligonucleótido se alinea a uno o varios sitios homólogos en la cadena de ADN desnaturalizada. Para evitar las alineaciones que no son completamente homólogas se eleva nuevamente la temperatura a 54°C y finalmente se mantiene la temperatura óptima para la enzima (72°C) y de esta forma comenzar la fase de replicación. Los segmentos de ADN amplificados con esta técnica son separados por medio de electroforesis en geles de agarosa, teñidos con bromuro de etidio y visualizados con luz ultravioleta (Welsh y McClelland, 1990; Williams *et al.*, 1990; Rafalski *et al.*, 1991; Whitkus *et al.*, 1994).

Esta técnica se basa en la probabilidad estadística de que se presenten sitios complementarios al oligonucleótido a lo largo del genoma. Las bandas son generadas por la existencia de varios sitios de acoplamiento para un oligonucleótido particular. Los polimorfismos (e.g., las diferencias en el número de bandas) entre los individuos generados por los RAPDs se deben a cambios en la secuencia de los nucleótidos en los sitios de acoplamiento y por inserción o deleción de los fragmentos en estos sitios (Williams *et al.*, 1990). Como una regla, los productos de amplificación individuales representan un alelo por locus (Vaughn y Powell, 1992). Las mutaciones que inhiben el alineamiento del oligonucleótido o que de alguna forma previenen la amplificación son detectadas por la ausencia (e.g., pérdida de bandas) de fragmentos amplificables de ADN.

Con esta técnica no es posible distinguir homocigos dominantes de heterocigos para un fragmento particular (Whitkus *et al.*, 1994; Backeljau *et al.*, 1995).

Los RAPDs se conocen como marcadores dominantes/recesivos ya que el carácter que se obtiene es la presencia/ausencia de una secuencia amplificable de ADN. Por lo tanto, los términos dominante y recesivo aplicados a los datos de RAPDs sólo se refieren a la amplificación o no durante la reacción en cadena de la polimerasa.

Desde la proposición de los RAPDs como marcadores moleculares se han desarrollado diversas modificaciones; además del ya mencionado AP-PCR, existe la propuesta del llamado DAF (DNA Amplification Fingerprinting) (Caetano-Anollés *et al.*, 1991). Las ventajas de los RAPDs en términos de costo y tiempo, han hecho de este marcador molecular uno de los más utilizados en diversos campos de la biología.

El objetivo de este artículo es presentar una revisión del uso de los RAPDs como marcadores moleculares tanto de su marco teórico y sus métodos de análisis, como su aplicación a disjuntos problemas de las ciencias vegetales. Se discuten las ventajas y desventajas de estos marcadores comparándolos con otros reportados en la literatura. Esta revisión consistió en una búsqueda exhaustiva de la bibliografía disponible sobre el tema. Se revisaron un total de 389 de 459 artículos publicados. Se describen algunos ejemplos representativos de la literatura y el resto se presentan en diferentes cuadros de acuerdo con su temática.

Los RAPDs como marcadores moleculares

En esta sección se presentan las principales aplicaciones de los RAPDs como marcadores moleculares en diversos problemas de genética, ecología y evolución de las plantas.

Estudios de mapeo genético e identificación de caracteres de interés. La elaboración de mapas genéticos es una herramienta importante para diseñar estrategias dentro de los programas de producción, ya que permite manipular características de interés agrícola con cierto grado de confiabilidad. Utilizando tanto líneas isogénicas como diferentes generaciones (F_1 , F_2) de plantas cultivadas, se ha logrado identificar rápidamente marcadores ligados a genes de resistencia a diferentes enfermedades causados por virus, bacterias, hongos, insectos y nemátodos (cuadros 1, 2 y 3). Una de las especies más estudiadas es el tomate en donde en pocos años se han detectado genes de resistencia a hongos, nemátodos y algunos virus (Bai *et al.*, 1995; Klein-Lankhorst *et al.*, 1991; Kawchik *et al.*, 1994; Ohmori *et al.*, 1995, 1996). Dweikat *et al.* (1994, 1997) identificó marcadores RAPDs asociados a dos o más genes que confieren resistencia contra el insecto *Myetiola destructor*, una de las principales plagas de

LOS RAPDs COMO MARCADORES MOLECULARES

Cuadro 1. Estudios sobre identificación de características de interés utilizando RAPDs como marcadores moleculares.

Familia	Especies	Objetivo	Nivel de estudio	Referencia
Anacardiaceae	<i>Pistacia vera</i>	Determinación del sexo	Híbridos	Hormaza <i>et al.</i> (1994b)
Asteraceae	<i>Helianthus annuus</i>	Resistencia a hongos	Progenie F2	Lawson <i>et al.</i> (1996)
Cariophyllaceae	<i>Silene latifolia</i>	Determinación del sexo	Individuos	Mulcahy <i>et al.</i> (1992)
Chenopodiaceae	<i>Beta vulgaris</i>	Esterilidad o fertilidad masculina	Líneas isogénicas	Lorenz <i>et al.</i> (1997)
Cruciferae	<i>Brassica napus</i> <i>B. napus</i> y <i>B. rapa</i>	Esterilidad masculina Concentración de ácido palmítico y linoleico	Cultivares Progenie F2	Delourme <i>et al.</i> (1994) Tanhuanpää <i>et al.</i> (1995 a b)
Euphorbiaceae	<i>Manihot esculenta</i>	Apomixis	Híbridos	Crattapaglia <i>et al.</i> (1996 b)
Gramineae	<i>Avena</i> spp. <i>Digitalis obscura</i> <i>Hordium</i> sp. <i>Hordeum vulgare</i> <i>H. vulgare</i> <i>H. vulgare</i> <i>Oryza sativa</i> <i>O. sativa</i> <i>Pennisetum ciliare</i> <i>Pennisetum</i> spp. <i>Triticum aestivum</i> <i>Triticum</i> spp. <i>Zea mays</i>	Genes de asimilación de cadmio Síntesis de cardenoloides Resistencia a hongos Resistencia a virus Requerimiento de energía Resistencia a hongos Resistencia a insectos Esterilidad masculina Apomixis Apomixis Resistencia a hongos Resistencia a insectos Varias características Embriogénesis somática Identificación de progenies de autofecundación y de fecundación cruzada Resistencia a hongos Resistencia a hongos Resistencia a plagas Resistencia a hongos Resistencia a enfermedades Resistencia a virus Morfología de polen	Líneas isogénicas Poblaciones (cultivo de tejidos) Progenie F2 Cultivares Población doble haploide Progenie F1 Progenie F1 Cultivares Cultivares Especies y variedades Líneas isogénicas Líneas isogénicas Individuos Progenie F1 Población Líneas isogénicas Cultivares Progenie F2 Líneas isogénicas Progenie F2 Progenie F2 Especies	Penner <i>et al.</i> (1995) Gavito <i>et al.</i> (1990) Barua <i>et al.</i> (1993) Ordon <i>et al.</i> (1997) Chalmers <i>et al.</i> (1993) Kutcher <i>et al.</i> (1996) Nair <i>et al.</i> (1995) Zhang <i>et al.</i> (1997) Custine <i>et al.</i> (1996) Lubbers <i>et al.</i> (1994) Procunier <i>et al.</i> (1995) Dweikat <i>et al.</i> (1994, 1997) Goumet & Rayburn (1996) Yu y Pauls (1993) Gjuric y Smith (1996) Young y Kelly (1996) Haley <i>et al.</i> (1993) y Johnson <i>et al.</i> (1995) Haley <i>et al.</i> (1994 a) Mahé <i>et al.</i> (1995) Miklas <i>et al.</i> (1996) Urrea <i>et al.</i> (1996) Gambier y Mulcahy (1996)
Leguminosae	<i>Medicago sativa</i> <i>M. sativa</i> <i>Phaseolus vulgaris</i> <i>P. vulgaris</i> <i>P. vulgaris</i> <i>P. vulgaris</i> <i>P. vulgaris</i> <i>P. vulgaris</i>	Embriogénesis somática Identificación de progenies de autofecundación y de fecundación cruzada Resistencia a hongos Resistencia a hongos Resistencia a plagas Resistencia a hongos Resistencia a enfermedades Resistencia a virus Morfología de polen	Líneas isogénicas Población Líneas isogénicas Cultivares Progenie F2 Líneas isogénicas Progenie F2 Progenie F2 Especies	Yu y Pauls (1993) Gjuric y Smith (1996) Young y Kelly (1996) Haley <i>et al.</i> (1993) y Johnson <i>et al.</i> (1995) Haley <i>et al.</i> (1994 a) Mahé <i>et al.</i> (1995) Miklas <i>et al.</i> (1996) Urrea <i>et al.</i> (1996) Gambier y Mulcahy (1996)
Onagraceae	<i>Oenothera villaricae</i> y <i>O. picensis</i>	Morfología de polen	Especies	Gambier y Mulcahy (1996)
Pinaceae	<i>Picea abies</i> <i>Pinus pinaster</i>	Dominancia apical Genes ligados a crecimiento	Progenie F2 Progenie F2	Lehner <i>et al.</i> (1995) Plomion <i>et al.</i> (1996 a)
Rosaceae	<i>Malus floribunda</i> <i>Prunus persica</i> y <i>P. dulcis</i>	Resistencia a hongos Genes de interés económico	Cultivares Híbridos interespecíficos	Yang y Krueger (1994) y Yang <i>et al.</i> (1997) Warburton <i>et al.</i> (1996)
Solanaceae	<i>Capsicum</i> spp. <i>Lycopersicon esculentum</i> <i>L. esculentum</i> <i>L. esculentum</i> <i>Nicotiana debneyi</i>	Crecimiento anormal Resistencia a nemátodos Resistencia a hongos Resistencia a virus Resistencia a hongos	Híbridos interespecíficos Líneas isogénicas Líneas isogénicas Líneas isogénicas Líneas isogénicas	Inai <i>et al.</i> (1993) Klein-Lankhorst <i>et al.</i> (1991) Kawchuk <i>et al.</i> (1994) Ohmori <i>et al.</i> (1995, 1996) Bai <i>et al.</i> (1995)

Cuadro 2. Lista de estudios de mapeo de cromosomas utilizando RAPDs como marcadores moleculares.

Familia	Especie	Nivel de estudio	Referencia
Asteraceae	<i>Helianthus anomalous</i>	Híbrido	Rieseberg <i>et al.</i> (1993)
Caricaceae	<i>Carica papaya</i>	Progenie F2	Sondur <i>et al.</i> (1996)
Convolvulaceae	<i>Ipomea batatas</i>	Progenie F1	Thompson <i>et al.</i> (1997)
Cruciferae	<i>Brassica napus</i>	Progenie doble-haploide	Foisset <i>et al.</i> (1996)
	<i>B. nigra</i>	Progenie F2	Truco y Quiros (1994)
Cucurbitaceae	<i>Citrullus lanatus</i>	Híbridos	Hashizume <i>et al.</i> (1996)
	<i>Cucumis sativus</i> var. <i>sativus</i>	Progenies F2 y F3	Kennard <i>et al.</i> (1994)
Ericaceae	<i>Vaccinium darrow</i> y <i>V. corymbosum</i>	Híbridos interespecíficos	Qu y Hancock (1997)
	<i>V. darrowi</i> y <i>V. elliotii</i>	Híbridos interespecíficos	Rowland y Levi (1994)
Graminae	<i>Daucus carota</i> ssp. <i>sativus</i>	Progenie F2	Schulz <i>et al.</i> (1994)
	<i>Hordeum vulgare</i>	Progenie doble-haploide	Giese <i>et al.</i> (1994)
	<i>Saccharum officinarum</i>	Progenie F1	Mudge <i>et al.</i> (1996)
	<i>S. officinarum</i> y <i>S. robustum</i>	Híbridos interespecíficos	Al-Janabi <i>et al.</i> (1994)
	<i>Sorghum bicolor</i> ssp. <i>bicolor</i>	Progenies F1, F2 y F3	Pammí <i>et al.</i> (1994)
	<i>S. bicolor</i> x <i>S. robustum</i>	Progenie F2	Chittenden <i>et al.</i> (1994)
	<i>Zea mays</i>	Progenie F2	Beaumont <i>et al.</i> (1996)
	<i>Z. mays</i>	Cultivares	Lin y Chou (1997)
Leguminosae	<i>Mimulus platycalyx</i> y <i>M. guttatus</i>	Híbridos interespecíficos	Lin y Ritland (1996)
	<i>Vicia faba</i>	Progenie F2	Satovic <i>et al.</i> (1996)
	<i>Vigna angularis</i> y <i>V. nakashimae</i>	Progenie F2	Kaga <i>et al.</i> (1996 a)
Liliaceae	<i>Asparagus officinalis</i>	Cultivares	Jiang <i>et al.</i> (1997)
Musaceae	<i>Musa acuminata</i>	Progenie F2	Fauré <i>et al.</i> (1993)
Myrtaceae	<i>Eucalyptus nitens</i>	Segregación en tres generaciones	Byrne <i>et al.</i> (1995)
	<i>E. urophylla</i> y <i>E. grandis</i>	Híbridos interespecíficos	Verhaegen y Plomion (1996)
Pinaceae	<i>Picea abies</i>	Progenie F1	Binelli y Buccì (1994)
	<i>Pinus brutia</i>	Progenie F1 (tejido haploide)	Kaya y Neale (1995)
	<i>P. elliotii</i> var. <i>elliotii</i>	Progenie F1	Nelson <i>et al.</i> (1993)
	<i>P. palustris</i> y <i>P. elliotii</i>	Híbridos interespecíficos	Kubisiak <i>et al.</i> (1995)
	<i>P. pinaster</i>	Progenie F2	Plomion <i>et al.</i> (1995 a,b)
	<i>P. radiata</i>	Población (segregación en tres generaciones)	Devey <i>et al.</i> (1996)
Rosaceae	<i>Prunus avium</i>	Población	Stockinger <i>et al.</i> (1996)
	<i>P. persica</i>	Progenie F2	Rajapakse <i>et al.</i> (1995) y Chaparro <i>et al.</i> (1994)
Rutaceae	<i>Citrus grandis</i> y <i>Poncirus trifoliata</i>	Híbridos intergenéricos	Cai <i>et al.</i> (1994)
Salicaceae	<i>Populus trichocarpa</i> y <i>P. deltoides</i>	Híbridos interespecíficos	Bradshaw <i>et al.</i> (1994)
Solanaceae	<i>Lycopersicon esculentum</i> y <i>L. pimpinellifolium</i>	Progenie F2	Grandillo y Tanksley (1996)
	<i>L. esculentum</i> y <i>L. plennellii</i>	Progenie F1	Froiland <i>et al.</i> (1993)
	<i>Lycopersicon</i> spp.	Progenie F2 e híbridos interespecíficos	Chunwongse <i>et al.</i> (1994)
	<i>Lycopersicon</i> spp.	Híbridos interespecíficos	Klein-Lankhorst <i>et al.</i> (1991)
Solanaceae	<i>Petunia</i> spp.	Cultivares	Peltier <i>et al.</i> (1994)
Sterculiaceae	<i>Theobroma cacao</i>	Progenie F2	Lanaud <i>et al.</i> (1995)
Taxodiaceae	<i>Cryptomeria japonica</i>	Segregación en tres generaciones	Mukai <i>et al.</i> (1995)
Umbelaceae	<i>Apium graveolens</i> var. <i>rapaceum</i> y var. <i>secalinum</i>	Progenie F2	Yang y Quiros (1995)

este cultivo (*Triticum aestivum*). Con 18 oligonucleótidos identificaron marcadores asociados a once diferentes loci de resistencia logrando distinguir entre líneas con o sin resistencia.

Michelmore *et al.* (1991) desarrollaron el método de análisis de segregación en conjunto para identificar marcadores en regiones específicas del genoma. Dentro de cada conjunto los individuos son idénticos para la característica o gen de interés. Dos conjuntos contrastantes para la característica de interés pueden ser polimórficos o monomórficos para el resto de las regiones. Al analizar ambos conjuntos se identifican a los marcadores que los distinguen. Ellos identificaron eficientemente marcadores RAPDs ligados a un gen de resistencia a patógenos para el cual no existían líneas isogénicas cercanas.

Algunos mapas se han elaborado con poblaciones doble-haploide, lo cual es más recomendable si se utilizan RAPDs como marcadores ya que con estas poblaciones hay una mejor estimación de la frecuencia de recombinación obtenida para marcadores dominantes (Foisset *et al.*, 1996).

En plantas, uno de los problemas más intrigantes ha sido la determinación del sexo. El dioicismo por ejemplo, ha evolucionado independientemente en diferentes familias y géneros y existen diferentes mecanismos de regulación genética. Un análisis de segregación utilizando RAPDs permite identificar marcadores asociados al sexo. El reconocimiento del sexo fuera de su fase reproductiva tiene implicaciones muy relevantes en las investigaciones tanto de plantas cultivadas como silvestres. Para mencionar un caso, el estudio de la selección sexual en las plantas perennes podría tener un salto cualitativo si se pudieran sexar las plántulas y juveniles de las poblaciones naturales.

El heteromorfismo cromosómico entre sexos es poco común en plantas; uno de los pocos géneros con esta diferenciación es *Silene* que presenta cromosomas femeninos y masculinos. Mulcahy *et al.* (1992) encontró marcadores producidos por RAPDs asociados al sexo en *Silene latifolia*. Por su parte, Hormaza *et al.* (1994 b) encontró oligonucleótidos específicos asociados al sexo de *Pistacia vera*. La expresión del sexo en *Asparagus officinalis* es controlado por el gen M (Jiang *et al.*, 1997), siendo los machos heterocigotos y las hembras homocigotas. Estos autores encontraron dos fragmentos generados por el mismo oligonucleótido para diferenciar machos y hembras.

El análisis de segregación en cruces entre genotipos cercanos ha revelado algunos genes responsables de características de los sistemas de apareamiento en plantas (Hormaza *et al.*, 1994 b; Lubbers *et al.*, 1994; Gaubier y Mulcahy, 1996). El mapeo de caracteres

cuantitativos permite entender de forma más precisa los sistemas de apareamiento. La técnica de RAPDs es una de las más sencillas y accesibles para mapeo genético de especies silvestres. Existen varios mapas generados en plantas cultivadas pero éstos no explican los cambios evolutivos que ocurren en la naturaleza. Por esto, es necesario hacer estudios detallados en poblaciones silvestres. Hasta el momento, se han hecho mapas genéticos con RAPDs para tres géneros silvestres: *Microseris* (van Houten *et al.*, 1994; Homberger y Bachman, 1995), *Helianthus* (Rieseberg *et al.*, 1993) y *Mimulus* (Lin y Ritland, 1996). Estos mapas han permitido examinar las bases genéticas de caracteres morfológicos en *Mimulus*, analizar los grupos de genes ligados para estudios de introgresión e hibridación entre especies de *Helianthus* y estimar la aditividad, dominancia y efectos epistáticos de las características cuantitativas en la evolución del apareamiento de *Mimulus* (Lin y Ritland, 1996).

Identificación genética

El análisis de ADN amplificado usando la técnica de RAPDs ha permitido generar información sobre la identificación molecular de individuos, la estructura de apareamiento local y las relaciones de parentesco (paternidad) (cuadro 4).

Una de las mejores aplicaciones de los RAPDs como marcadores es la identificación genética de individuos dado el gran polimorfismo que detectan. Esta identificación incluye casos de clones, híbridos somáticos, mutantes, etc. Otra aplicación paralela es la detección de uniformidad genética con un marcador eficiente y rápido, lo cual puede ser útil en la determinación de estabilidad genética en programas de reforestación.

La teoría clásica de regulación poblacional se basa en un concepto de individuo bien delimitado (Antonovics y Levin, 1980). Sin embargo, en plantas clonales la organización jerárquica no permite la delimitación del individuo o "genet". Un "genet" comprende unidades funcionales conocidas como "ramets" los cuales son potencialmente independientes fisiológicamente. La mayor parte de los estudios de dinámica y regulación de poblaciones de plantas clonales se han enfocado al nivel de "ramets" ya que es muy difícil identificar en el campo a los "genets". Sin embargo, el probar hipótesis sobre la estructura de las poblaciones de especies clonales requiere de la identificación inequívoca de los "genets".

El análisis con RAPDs es un método robusto para probar hipótesis de estructura poblacional clonal, ya que permite la identificación genética de los individuos producidos tanto por vías asexuales como sexua-

Cuadro 3. Estudios sobre mapeo genético de genes o loci específicos utilizando RAPDs como marcadores moleculares.

Familia	Especie	Objetivo	Nivel taxonomico	Referencia
Asteraceae	<i>Helianthus annuus</i>	Gen P11, resistencia a <i>Plasmopara halstedii</i>	Progenie F2	Mouzeyar et al. (1995)
	<i>Lactuca sativa</i>	Gen Tu, resistencia al virus del mosaico	Varietades (progenie F3)	Robbins et al. (1994)
	<i>L. serriola</i>	Genes R17 y R18, resistencia a <i>Bremia lactucae</i>	Progenies F2 y F3	Maisonneuve et al. (1994)
	<i>Microseris douglasii</i> y <i>M. bigelovii</i>	Gen que regula la formación de tricomas	Progenie F2	Hombergen y Bächmann (1995).
Chenopodiaceae	<i>Beta vulgaris</i>	Resistencia a <i>Heterodera schachtii</i>	Subespecies, progenie F2	Schoiten et al. (1997)
	<i>B. vulgaris</i>	Resistencia a <i>H. schachtii</i> y color del hipocótilo	Cultivares (progenie F2)	Uphoff y Wricke (1992)
	<i>B. vulgaris</i> y <i>B. patellaris</i>	Locus Hs1 ^{PM-1} , resistencia a <i>Heterodera schachtii</i>	Cultivares	Salentijn et al. (1995)
Cruciferae	<i>Brassica napus</i>	Gen Pgi-2-Rfo restaurador de la fertilidad masculina	Cultivares (progenie F2 y doble haploide)	Delourme et al. (1994)
	<i>B. napus</i>	Gen Bzh	Líneas isogénicas cercanas y progenie doble-haploide	Foisset et al. (1995).
	<i>B. napus</i>	Varias características	Progenie doble haploide	Foisset et al. (1996)
	<i>B. napus</i>	Genes responsables de la concentración de ácido linoleico	Progenie F2	Hu et al. (1995)
	<i>B. oleraceae</i>	Gen S1 de autoincompatibilidad	Híbridos interespecíficos	Camargo et al. (1997)
	<i>B. rapa</i> ssp. <i>oleifera</i>	Locus que afecta la concentración de ácido oléico	Cultivares (progenie F2)	Tanhuanpää et al. (1996)
Cucurbitaceae	<i>Cucumis sativus</i> var. <i>sativus</i> y <i>C. s.</i> var. <i>hardwickii</i>	Genes de resistencia y marcadores morfológicos	Progenie F2	Kennard et al. (1994)
Gramineae	<i>Oryza sativa</i>	Gen Gm2, y Gm 4t resistencia a <i>Orseolia oryzae</i>	Líneas isogénicas, progenies F5, F6 y F3	Mohan et al. (1994) Nair et al. (1995, 1996)
	<i>O. sativa</i>	Gen de esterilidad masculina	Cultivares (progenies F2)	Wang et al. (1995)
	<i>Oryza</i> sp.	Gen xa-13, resistencia a <i>Xanthosomonas oryzae</i>	Líneas isogénicas y progenie F2	Zhang et al. (1996)
	<i>Triticum aestivum</i>	Loci 1RS de <i>Secale cereale</i>	Líneas isogénicas	Iqbal y Rayburn (1995)
	<i>T. spelta</i>	Gen Lr9 y Gen Lr24	Líneas isogénicas (progenies F2 y F3)	Schachermayr et al. (1994 y 1995)
	<i>T. turgidum</i> var. <i>durum</i>	Genes OPC-20 y UBC-180, Torna de cadmio	Progenie F1	Penner et al. (1995)
	<i>T. aestivum</i>	Genes de resistencia Lr29 y Lr25	Líneas isogénicas	Procunier et al. (1995)

LOS RAPDs COMO MARCADORES MOLECULARES

Familia	Especie	Objetivo	Nivel taxonomico	Referencia
Leguminosae	<i>Glycine max</i> y <i>C. soya</i>	Loci que controla el peso de la semilla	Híbridos interespecíficos	Maughan <i>et al.</i> (1996)
	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Gen Are, resistencia a <i>Collectotrichum lindemuthianum</i>	Líneas isogénicas	Adam-Biondon <i>et al.</i> (1994)
	<i>P. vulgaris</i>	Locus Ue-3, resistencia a <i>Uromyces appendiculatus</i>	Líneas isogénicas	Haley <i>et al.</i> (1994b)
	<i>P. vulgaris</i>	Gen Are, resistencia a <i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	Cultivares	Young y Kelly (1996)
	<i>Pisum sativum</i>	Loci que afecta el peso de la semilla	Cultivares (progenie F3)	Timmerman-Vaughan <i>et al.</i> (1996)
Myrtaceae	<i>Eucalyptus grandis</i> y <i>E. urophylla</i>	Loci que controla la propagación vegetativa	Progenie F1	Grattapaglia <i>et al.</i> (1995 y 1996 a)
	<i>Pinus elliotii</i> var. <i>elliottii</i>	Resistencia a <i>Cronartium quercuum</i> t. sp. <i>fusiorme</i>	Población (clones y su progenie)	Nelson <i>et al.</i> (1993)
Pinaceae	<i>P. pinaster</i>	Altura de plántulas	Progenie F2	Plomion <i>et al.</i> (1996a)
	<i>P. pinaster</i>	Careno δ-3	Progenie F2	Plomion <i>et al.</i> (1996)
Rosaceae	<i>Malus floribunda</i>	Gen V1, resistencia a <i>Venturia inaequalis</i>	Progenie F1	Tartarini (1996)
	<i>Malus</i> sp.	Gen Sd-1, resistencia a <i>Dysaphis devectora</i>	Cultivares	Roche <i>et al.</i> (1997)
	<i>Malus</i> sp.	Gen V1, resistencia a <i>Venturia inaequalis</i>	Cultivares	Yang y Korban (1996) y Yang <i>et al.</i> (1997)
	<i>Prunus persica</i> y <i>P. davidiana</i>	Resistencia a <i>Sphaerotheca pannosa</i>	Híbridos interespecíficos	Dirlwanger <i>et al.</i> (1996)
Solanaceae	<i>P. persica</i> y <i>P. dulcis</i>	Varias características	Híbridos interespecíficos (progenies F2 y F3)	Warburton <i>et al.</i> (1996)
	<i>Lycopersicon esculentum</i>	Gen Sw-5, resistencia al virus TSWV	Varietades (progenie F2)	Chagué <i>et al.</i> (1996)
	<i>L. esculentum</i>	Gen M1, resistencia a nematodos	Líneas isogénicas y progenie F2	Williamson <i>et al.</i> (1994)
	<i>L. esculentum</i> y <i>L. hirsutum</i>	Gen O1-1, resistencia a <i>Oidium lycopersicum</i>	Híbridos interespecíficos (progenies F2 y F3)	van der Beek <i>et al.</i> (1994)
	<i>L. esculentum</i> y <i>L. peruvianum</i>	Gen Tm-2, resistencia al virus del mosaico	Híbridos interespecíficos (Progenie F2)	Dax <i>et al.</i> (1993)
Ulmaceae	<i>L. esculentum</i>	Resistencia al virus TSWV	Líneas isogénicas	Stevens <i>et al.</i> (1995)
	<i>Lycopersicon</i> spp.	Gen Lv, resistencia a <i>Leveillula taurica</i>	Progenie F2 e híbridos interespecíficos	Chunwongse <i>et al.</i> (1994)
	<i>Solanum</i> spp.	Loci que controla la latencia del tubérculo	Híbridos interespecíficos	Freyre <i>et al.</i> (1994)
Ulmaceae	<i>Ulmus</i> spp.	Gen B1s, resistencia a <i>Stegophora ulmea</i>	Híbridos interespecíficos	Benet <i>et al.</i> (1995)

les (Castiglione *et al.*, 1993; Eriksson y Breiner, 1993; Trame *et al.*, 1995; Miller *et al.*, 1996; Scheepers *et al.*, 1997). Eriksson y Breiner (1993) en un estudio de regulación poblacional de *Rubus saxatilis* identificaron genéticamente a los "genets" y sus resultados fueron contrastantes a los encontrados utilizando "ramets" (Hutchings, 1979).

En este tipo de estudios los RAPDs son preferibles a las enzimas o a otros marcadores moleculares ya que la dominancia no impide la identificación, la cual se ve más bien afectada por los niveles de polimorfismo dentro de la especie. Por ejemplo, Rosetto *et al.* (1995) obtuvieron una probabilidad de 4.3×10^{-10} de encontrar dos individuos con el mismo patrón de bandeos para once oligonucleótidos en poblaciones de *Grevillea scapigera*. Esto nos da una idea de la capacidad de identificación individual de este marcador.

Un factor importante en los programas de provechamiento de especies cultivadas es el incremento de la capacidad genética de las especies. Las especies silvestres emparentadas con las cultivadas son cruzadas para introducir genes específicos dentro de las cultivadas. Cuando la incompatibilidad sexual o las distancias genéticas impiden la introducción sexual de recursos genéticos, la hibridización somática puede usarse para combinar genomas completos o parciales. Esta técnica comprende el aislamiento y fusión del protoplasma y la regeneración de plantas maduras a partir de las células fusionadas. Una selección *in vitro* de los posibles híbridos somáticos se lleva a cabo para escoger a los genotipos que tienen las características seleccionadas (Kaendler *et al.*, 1996).

Baird *et al.*, (1992) describe un método basado en el uso de los RAPDs para identificar inequívocamente híbridos somáticos intra e inter-específicos en los primeros estadios de regeneración utilizando uno y dos oligonucleótidos. El uso de un sólo oligonucleótido genera una amplificación típica para cada genotipo de los donadores y confirma la presencia de estos genotipos en los híbridos. El uso de dos oligonucleótidos, en donde cada uno de éstos ha amplificado fragmentos específicos para cada donador, da información adicional para identificar la hibridización somática.

Por otra parte, existen mutaciones somáticas que afectan la estructura y productividad vegetal. Las plantas con estas mutaciones pueden diferir del resto de los individuos de la especie en algunas características morfológicas aunque es muy difícil distinguirlas genéticamente. El uso de RAPDs ha sido exitoso para distinguir mutantes generados con rayos X del híbrido entre *Prunus cerasus* x *P. canescens* con 60 oligonucleótidos (Yang y Schmidt, 1994) y mutantes del limón (*Citrus limon*) con 22 oligonucleótidos (Deng *et al.*, 1995). Sin embargo, Wolf y Peters-van Rijn (1993)

no pudieron distinguir treinta mutantes del crisantemo (*Dendranthema grandiflora*) que diferían en el color de las flores.

Otra aplicación interesante es la detección de estabilidad genética en especies de plantas propagadas por cultivo de tejidos. Por ejemplo, utilizando RAPDs como marcadores, Isabel *et al.* (1993) en *Picea mariana* y Heinze y Schmidt (1995) en *P. abies* no detectaron variación en plantas propagadas para programas de reforestación. Por su parte, Martín y Pérez (1994) encontraron el uso de los RAPDs como un marcador útil para detectar tanto diversidad como estabilidad genética para propagar plantas en peligro de extinción.

Genética de poblaciones

La extensión y distribución de la diversidad genética de las poblaciones es el resultado de la interacción entre mutación, migración, selección y deriva (Wright, 1978). El estudio de la estructura genética de poblaciones es esencial para entender y predecir los efectos genéticos en la evolución de las mismas. Además, estos estudios han recibido una mayor atención recientemente debido a su importancia dentro del área de la biología de la conservación para la cual la dinámica poblacional y la variabilidad genética son de especial interés.

Para algunas aplicaciones como la comparación de niveles de heterocigosidad interpoblacional o para probar la ventaja selectiva de una proteína, la electroforesis de enzimas es sin duda la técnica más práctica. Pero, para algunos problemas como la estimación del tamaño efectivo de la población (ver Lande y Barrowclough, 1987), el dilucidar si existe un aislamiento reproductivo entre poblaciones, estimar los niveles de entrecruzamiento (Fritsch y Rieseberg, 1992), estudiar las relaciones de parentesco (Philbrick, 1993) y el relacionar las distancias genéticas con características geográficas (de la Cruz *et al.*, 1995) o funcionales (Whitty *et al.*, 1994) al parecer los RAPDs han sido más prácticos y eficientes.

Las enzimas son uno de los métodos más frecuentemente utilizados para analizar la estructura genética de las poblaciones debido a que presentan loci codominantes, pero en los casos en que hay poca variabilidad genética, los RAPDs son más adecuados (Mosseler *et al.*, 1992) ya que han detectado una mayor variación que las enzimas (ver cuadro 5).

En muchas especies el éxito reproductivo femenino (medida de la adecuación en función de la reproducción) puede estimarse de manera sencilla por medio de la producción de semillas. Por el contrario, el éxito reproductivo masculino es sumamente difícil de asignar ya que la descendencia no puede

ser asociada directamente con el progenitor masculino. Pese a esto, el éxito reproductivo masculino es un componente importante de la adecuación y su estimación es de gran interés en biología evolutiva. A pesar de su dominancia, los RAPDs tienen la ventaja de presentar un número mayor de loci que los que pueden obtenerse con enzimas, esto aumenta su capacidad para estimar la probabilidad de asignación de paternidad. Si el tamaño de muestra es pequeño y se requiere un alto grado de exclusión, probablemente un marcador codominante nos de mayor información, pero conforme aumenta el tamaño de muestra algunos autores han sugerido que los RAPDs pueden ser una mejor opción (Lewis y Snow, 1992; Mungai y McMurtry, 1993).

Hibridización interespecífica

La identificación de especies híbridas permite inferir las rutas evolutivas seguidas por las especies involucradas en estudios posteriores de filogenia molecular ya que elimina la posibilidad de confusión de resultados en la interpretación de análisis cladísticos. Estos estudios también son importantes porque sientan las bases para investigaciones a nivel poblacional del impacto de la hibridación en la integridad de las especies paternas.

Los RAPDs han sido utilizados para identificar individuos de origen híbrido en diferentes familias (cuadro 6).

Se han utilizado diferentes técnicas para la identificación de híbridos. Sin embargo, el análisis directo del ADN ha dado los resultados más satisfactorios para detectar hibridación vegetal. Los RAPDs se han preferido a otro tipo de marcadores moleculares gracias a la gran variación que detectan (Smith *et al.*, 1996). A pesar de que la variación detectada por RAPDs no siempre puede inferirse como el resultado de polimorfismo para un loci específico, estudios de segregación muestran que una gran proporción de estos marcadores pueden ser considerados como caracteres mendelianos (Williams *et al.*, 1990; Bucci y Menozzi, 1993) y que son heredados como dominantes (Williams *et al.*, 1990). Estas características son críticas para la detección de hibridación interespecífica (Smith *et al.*, 1996).

Identificación y relaciones genéticas de cultivares y variedades

Desde que Welsh *et al.*, (1991) mostró que los RAPDs son una técnica eficiente para identificar genéticamente híbridos de maíz, se han utilizado ampliamente para identificar cultivares, variedades e híbridos (cuadro

4), así como para revelar los grados de diversidad genética entre cultivares y razas (cuadro 7).

El conocimiento de la variación genética intra- e inter-específica y de las relaciones genéticas entre colecciones, variedades, poblaciones y especies de plantas silvestres y cultivadas es fundamental para diversas aplicaciones. En los programas de entrecruzamiento de plantas, las estimaciones de las relaciones genéticas entre cultivares pueden ser útiles para la organización del germoplasma, la identificación de cultivares, la selección de progenitores para la conducción de hibridaciones y la reducción del número de colecciones necesarios para asegurar el muestreo de un amplio intervalo de la variabilidad genética (Thornhill *et al.*, 1997). Estos marcadores también son útiles para determinar los sitios de domesticación y origen de cultivos (e.g. de la Cruz *et al.*, 1993; Hill y Stalker, 1995).

Al parecer, los RAPDs como marcadores para identificar cultivares y sus parientes silvestres son sensibles al grado de diferenciación genética entre las entidades bajo estudio. Se ha demostrado que se requieren muy pocos oligonucleótidos para distinguir cultivares con propagación vegetativa (Koller *et al.*, 1993; Harada *et al.*, 1993) o con un alto grado de autofecundación (Dweicat *et al.*, 1993, 1997; Mercado *et al.*, 1996) y muchos cuando la diferenciación ha sido muy alta o con polinización cruzada (Zain *et al.*, 1944; de la Cruz *et al.*, 1993).

Análisis filogenético

En la actualidad ya existen muchos estudios filogenéticos con RAPDs (cuadro 8). La utilidad de los RAPDs para diferentes niveles taxonómicos fue investigada en *Juniperus* por Adams y Demeke (1993) quienes encontraron que algunos oligonucleótidos amplifican segmentos de ADN muy conservados que pueden ser utilizados para detectar polimorfismo en niveles superiores de clasificación (subgénero *Caryocedrus*, *Juniperus* y *Sabina*), mientras que otros oligonucleótidos amplifican ADN sumamente variable adecuado para la clasificación y análisis a nivel de especies. El estudio de Wilkie *et al.* (1993) demostró que el análisis con los marcadores RAPDs puede ser utilizado para estudiar las relaciones filogenéticas entre especies cercanas.

Whitty *et al.* (1994) mostraron el potencial de los RAPDs para separar el género de *Chamaecrista* (fijadores de nitrógeno) de grupos previamente congéntricos de *Cassia* y *Senna*. Encontraron una coincidencia de la variación genética con la localización geográfica para dos especies de *Chamaecrista* y una gran consistencia de la variación genética con la observada para

Cuadro 4. Listado de trabajos en los que se han utilizado los RAPDs como marcadores moleculares para la identificación genética a nivel infraespecífico.

Familia	Especie	Nivel taxonómico	Referencia
Actinidiaceae	<i>Actinidia</i> spp.	Cultivares y especies	Cipriani <i>et al.</i> (1996)
Amaranthaceae	<i>Amaranthus</i> spp.	Especies	Transue <i>et al.</i> (1994)
Annonaceae	<i>Annona</i> spp.	Cultivares	Ronning <i>et al.</i> (1995a)
Asteraceae	<i>Dendranthema grandiflora</i>	Cultivares	Wolff <i>et al.</i> (1995)
	<i>D. grandiflora</i>	Clones	Wolff (1996)
	<i>Ozothamnus diosmifolius</i>	Individuos	Ko <i>et al.</i> (1996)
Convolvulaceae	<i>Ipomea batatas</i>	Cultivares	Connolly <i>et al.</i> (1994)
Cruciferae	<i>Brassica napus</i>	Cultivares	Maiter <i>et al.</i> (1994)
	<i>B. oleracea</i> var. <i>capitata</i>	Cultivares	Phippen <i>et al.</i> (1997)
Cucurbitaceae	<i>Citrullus lanatus</i>	Cultivares	Lee <i>et al.</i> (1996)
Ericaceae	<i>Vaccinium macrocarpon</i>	Variedades	Novy <i>et al.</i> (1994)
Euphorbiaceae	<i>Euphorbia pulcherrima</i>	Cultivares	Ling <i>et al.</i> (1997)
Gesneriaceae	<i>Cyrtandra</i> spp.	Híbridos interespecíficos	Smith <i>et al.</i> (1996)
Gramineae	<i>Agrostis stolonifera</i>	Cultivares	Golembiewski <i>et al.</i> (1997)
	<i>Arrhenatherum elatius</i>	Genets	Miller <i>et al.</i> (1996)
	<i>Buchloë dactyloides</i>	Cultivares	Wu y Lin (1994)
	<i>Oryza sativa</i>	Cultivares	Fukuoka <i>et al.</i> (1992). Virk <i>et al.</i> (1995)
	<i>Oryza</i> spp.	Subespecies	Mackill (1995) y Martin <i>et al.</i> (1997)
	<i>Sacharum officinarum</i>	Intraclonal	Taylor <i>et al.</i> (1995)
	<i>Secale cereale</i>	Cultivares	Iqbal y Rayburn (1994)
Leguminosae	<i>Cajanus</i> spp., <i>Rhynchosia</i> spp., <i>Dunbaria ferruginea</i> y <i>Flemingia stricta</i>	Especies	Ratnaparkhe <i>et al.</i> (1995)
	<i>Glycine max</i>	Semillas	Shatters <i>et al.</i> (1995)
	<i>G. max</i>	Cultivares	Jianhua <i>et al.</i> (1996a)
	<i>Lolium</i> spp. y <i>Festuca</i> spp.	Especies	Wiesner <i>et al.</i> (1995)
	<i>Mangifera indica</i>	Cultivares y progenie F1	Schnell <i>et al.</i> (1995)
	<i>Medicago coerulea</i> , <i>M. falcata</i> y <i>M. sativa</i>	Mutantes meióticos	Barcaccia <i>et al.</i> (1994)
	<i>M. coerulea</i> , <i>M. falcata</i> y <i>M. sativa</i>	Híbridos interespecíficos	Barcaccia <i>et al.</i> (1995)
	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Cultivares	Johns <i>et al.</i> (1997)
	<i>Pisum sativum</i>	Cultivares	Samec y Nasinec (1995 y 1996)
Leguminosae y Gramineae	<i>Glycine max</i> y <i>Zea mays</i>	Individuos (semillas)	Jianhua <i>et al.</i> (1996b)
Liliaceae	<i>Lilium</i> spp.	Especies, híbridos y cultivares	Yamagishi (1995)
	<i>Zantedeschia</i> spp.	Cultivares	Hamada y Hagimori (1996)
Malvaceae	<i>Gossypium hirsutum</i> y <i>G. barbadense</i>	Cultivares	Multani y Lyon (1995)
Moraceae	<i>Ficus carica</i>	Variedades	Khadari <i>et al.</i> (1995)
Musaceae	<i>Musa</i> spp.	Cultivares y especies	Bhar <i>et al.</i> (1995)
Myrtaceae	<i>Eucalyptus</i> spp.	Genets	Keil y Griffin (1994)
Palmae	<i>Phoenix dactylifera</i>	Cultivares	Corniquel y Mercier (1994)
Pinaceae	<i>Picea abies</i>	Genets	Heinze y Schmidt (1995) y Schepers <i>et al.</i> (1997)
	<i>P. glauca</i> y <i>P. engelmannii</i>	Especies	Khasa y Dancik (1996)
	<i>P. mariana</i> y <i>P. rubens</i>	Especies e híbridos	Perron <i>et al.</i> (1995)
	<i>Pseudotsuga mienziesii</i>	Razas	Aagaard <i>et al.</i> (1995)
Plumbaginaceae	<i>Limonium estevei</i>	Clones	Martin y Perez (1994)
Rosaceae	<i>Fragaria ananassa</i>	Cultivares	Gidoni <i>et al.</i> (1994)
	<i>Fragaria</i> sp.	Cultivares	Parent y Pagé (1995)
	<i>Malus domestica</i>	Variedades	Tancred <i>et al.</i> (1994)
	<i>Malus</i> spp.	Especies y cultivares	Dunemann <i>et al.</i> (1994)

Familia	Especie	Nivel taxonómico	Referencia
	<i>Prunus cerasus</i> y <i>P. canescens</i> <i>P. persica</i>	Mutantes en híbridos interespecíficos Cultivares	Yang y Schmidt (1994) Lu Z.-X. et al. (1996)
	<i>Ribes nigrum</i> <i>Rosa</i> sp. <i>Rubus saxatilis</i>	Cultivares Cultivares Genets	Lanham et al. (1995) Gallego y Martínez (1996) Eriksson & Bremer (1993)
Rutaceae	<i>Rubus</i> spp. <i>Citrus</i> sp. <i>Citrus</i> sp.	Cultivares Clones Mutantes	Parent et al. (1993) Sugawara et al. (1995) Deng et al. (1995)
Salicaceae	<i>Populus</i> spp. <i>Populus</i> spp. <i>P. tremula</i> y <i>P. trichocarpa</i>	Genets Clones Genets	Castiglione et al. (1993) Lin et al. (1994) Sigurdsson et al. (1995)
Sapindaceae	<i>Simmondsia chinensis</i>	Genets	Amarger y Mercier (1995)
Crotonaceae	<i>Dipetalis obtusura</i>	Clones	Gavidia et al. (1996)
Solanaceae	<i>Lycopersicon esculentum</i> <i>Nicotiana</i> spp. <i>Solanum brevidens</i> y <i>S. tuberosum</i> <i>S. tuberosum</i>	Clones Híbridos somáticos Híbridos somáticos Cultivares	Bogani et al. (1996) De Filippis et al. (1996) Rokka et al. (1994) Mori et al. (1993) y Hosaka et al. (1994)
	<i>S. tuberosum</i> y <i>S. papita</i> <i>S. tuberosum</i> y <i>S. brevidens</i>	Híbridos somáticos Híbridos somáticos	Kaendler et al. (1996) Xu et al. (1993)
Umbelliferae	<i>Allium sativum</i>	Cultivares	Maaß y Klaas (1995)
Vitaceae	<i>Vitis vinifera</i> <i>V. vinifera</i>	Cultivares Clones y cultivares	Regner y Niessner (1993) Moreno et al. (1995)

la estructura del nódulo. Sus resultados muestran el potencial de los RAPDs para examinar caracteres genéticos, específicos y funcionales.

Algunos autores han explorado la capacidad de los RAPDs para inferencias filogenéticas usando métodos de parsimonia (Bacheljau et al., 1995; Rieseberg, 1996). La presencia compartida de un fragmento comparable de RAPDs puede usarse como estados de carácter en el análisis filogenético de parsimonia aunque se requiere necesariamente que los productos de amplificación (bandas de RAPDs) sean homólogos, independientes y variables.

Se han reportado ineficiencias para este propósito debido a que presentan algunos problemas conceptuales planteados por Bacheljau et al. (1995): *i)* los métodos de parsimonia carecen de un modelo apropiado para el estado de cambio de carácter de los RAPDs, *ii)* la interpretación alélica de los RAPDs es equivalente al modelo de alelos independientes para aloenzimas y es por lo tanto, inválida y *iii)* la sospecha de que las regiones de alineación ricas en GC están sesgadas, lo cual podría aumentar la frecuencia de homoplasia e incrementar el multialelismo. Por su parte, Rieseberg (1996) señala algunas consideraciones importantes: *i)* la presencia ausencia de las bandas de RAPDs puede depender de la presencia ausencia de

otros productos amplificables, *ii)* diferentes bandas de RAPDs pueden tener pesos moleculares similares y co-migrar en los geles y *iii)* algunos oligonucleótidos pueden producir bandas diferentes a pesar de que un análisis con enzimas de restricción (RFLPs) (ver M. Martínez, este número) muestren lo contrario.

Catalán et al. (1995) mostraron que existe homología en las bandas co-migrantes entre especies cercanas (infragenérico), pero que no hay homología cuando se comparan especies más distantes. Ellos sugieren probar la extensión taxonómica de la homología para estudios filogenéticos con estos marcadores.

Para probar la homología entre fragmentos de RAPDs en tres especies de girasoles del género *Helianthus*, Rieseberg (1996) analizó 220 fragmentos de los cuales el 91% resultaron ser homólogos indicando que la similitud en el tamaño del fragmento es un buen indicador o predictor de homología, al menos entre especies estrechamente relacionadas.

Biología de la conservación

Uno de los problemas que ha recibido una gran atención en los últimos años es el deterioro de los ecosistemas naturales y como consecuencia de esto, la disminución de la biodiversidad. En el área de la

Cuadro 5. Estudios de variación y estructura genética de poblaciones que utilizar RAPDs como marcadores moleculares.

Familia	Especie	Referencia
Alstroemeriaceae	<i>Alstroemeria</i> spp.	Anastassopoulos y Keil (1996)
Araliaceae	<i>Panax quinquefolius</i>	Bai <i>et al.</i> (1997)
Asteraceae	<i>Argyroxiphium sandwicense</i> <i>Cynara scolymus</i> <i>Microseris douglasii</i>	Friar <i>et al.</i> (1996) Tivang <i>et al.</i> (1996) Roelofs y Bachmann (1995)
Chenopodiaceae	<i>Beta vulgaris</i> <i>Salicornia</i> spp. y <i>Arthrocnemum macrostachyum</i>	Lorenz <i>et al.</i> (1994) Luque <i>et al.</i> (1995)
Cruciferae	<i>Brassica napus</i>	Hallden <i>et al.</i> (1994)
Dipterocarpaceae	<i>Shorea</i> spp.	Harada <i>et al.</i> (1994) y Novi <i>et al.</i> (1996)
Ericaceae	<i>Vaccinium macrocarpon</i>	Steward y Excoffier (1996)
Cesneriaceae	<i>Orobanche aegyptiaca</i> y <i>O. crenata</i>	Paran <i>et al.</i> (1997)
Gramineae	<i>Buchloe dactyloides</i> <i>Panicum virgatum</i> <i>Poa annua</i> <i>Sorghum bicolor</i>	Peakall <i>et al.</i> (1995) Gunter <i>et al.</i> (1996) Sweeney y Danneberger (1995) Menkir <i>et al.</i> (1997)
Lactucaceae	<i>Lactoris fernandeziana</i>	Brauner <i>et al.</i> (1992)
Leguminosae	<i>Glicine max</i> <i>Gliricidia sepium</i> y <i>G. maculata</i> <i>Lablab purpureus</i> <i>Medicago truncatula</i> <i>Phaseolus vulgaris</i> <i>P. vulgaris</i> <i>Trifolium pratense</i> <i>Vicia pispiformis</i>	Helms <i>et al.</i> (1997) Chalmers <i>et al.</i> (1992) Liu (1996) Bonnin <i>et al.</i> (1996) Haley <i>et al.</i> (1994c) Skroch y Nienhuis (1995 b) Kongkiatngam <i>et al.</i> (1995, 1996) Gustafsson y Gustafsson (1994)
Malvaceae	<i>Hibiscus corei</i> y <i>H. remota</i>	Steward y Porter (1995)
Moraceae	<i>Humulus lupulus</i>	Pillay y Kenny (1996) y Brady <i>et al.</i> (1996)
Myrtaceae	<i>Eucalyptus globulus</i> <i>Picea abies</i>	Nesbitt <i>et al.</i> (1995) Bucci y Menozzi (1995)
Palmae	<i>Elaeis guineensis</i>	Shah <i>et al.</i> (1994)
Pinaceae	<i>Pinus</i> spp. <i>P. sylvestris</i> <i>Pseudotsuga menziesii</i>	Mosseler <i>et al.</i> (1992) Szmíd <i>et al.</i> (1996) Aagaard <i>et al.</i> (1995)
Polygonaceae	<i>Fagopyrum esculentum</i>	Kump y Javornik (1996)
Proteaceae	<i>Grevillea scapigera</i>	Rossetto <i>et al.</i> (1995)
Rosaceae	<i>Prunus americana</i>	Gogorcena y Parfitt (1994)
Rubiaceae	<i>Coffea arabica</i>	Lashermes <i>et al.</i> (1996)
Salicaceae	<i>Populus tremuloides</i> <i>P. tremuloides</i> <i>P. tremuloides</i> y <i>P. grandidentata</i> <i>P. tremuloides</i>	Tuskan <i>et al.</i> (1996) Yeh <i>et al.</i> (1995) Liu y Furnier (1993) Chong <i>et al.</i> (1994)
Sapindaceae	<i>Simmondsia chinensis</i>	Amarzger y Mercier (1995)
Sterculiaceae	<i>Theobroma cacao</i> <i>T. cacao</i> <i>T. cacao</i>	Whitkus <i>et al.</i> (1997) N'Goran <i>et al.</i> (1994) Ruseil <i>et al.</i> (1993)
Umbelaceae	<i>Allium aaseae</i> y <i>A. similimum</i>	Smith y Pham (1996)

biología de la conservación, uno de los problemas relevantes es el estudio de organismos raros, endémicos o en peligro de extinción. Aunque existe una polémica con respecto a la relevancia de los componentes ecológicos o genéticos en los enfoques poblacionales de conservación (Lande 1988; Oyama, 1993), sin duda el uso de técnicas de PCR en general, ofrece la oportunidad de obtener información genética a partir de poco material orgánico para resolver problemas de conservación en poblaciones pequeñas (Amos y Hoelzel, 1992).

Existen algunas especies en donde la variación detectada con enzimas es poca o nula y utilizando RAPDs se ha podido detectar polimorfismos y describir su estructura genética (Mosseler *et al.*, 1992). Este es el caso de especies clonales, raras o de distribución muy restringida o que han experimentado disminuciones drásticas en su distribución y abundancia (Brauner *et al.*, 1992; Mosseler *et al.*, 1992; Gustafsson y Gustafsson, 1994; Rossetto *et al.*, 1995; Stewart y Porter, 1995; Friar *et al.*, 1996; Tuskan *et al.*, 1996).

El caso de una especie rara en donde se encontró un nivel de variación menor que el de otros géneros endémicos de la misma región es *Lactoris fernandeziana* (Brauner *et al.*, 1992). Este arbusto es poligamodioico y es el único representante vivo de la familia Lactoridaceae que es una familia muy primitiva de angiospermas. Su distribución se restringe a una isla del Archipiélago Juan Fernández de la costa de Chile. Esta planta es extremadamente rara y los análisis enzimáticos no revelaron variación genética (Crawford *et al.*, 1991). Para *Lactoris* el polimorfismo fue detectado con 16 oligonucleótidos que produjeron 106 bandas de las cuales 26 fueron polimórficas para un total de 27 plantas de 15 poblaciones (Brauner *et al.*, 1992).

Un caso interesante es el estudio de *Allium aaseae* (Alliaceae), una especie endémica de distribución restringida, en donde se detectaron niveles de variación genética con RAPDs comparables a especies de amplia distribución (Smith y Pham, 1996). Existen varios casos en la literatura en donde plantas raras o endémicas con distribuciones restringidas muestran mayor variación que sus congéneros con mayor amplitud de distribución (Karron 1987, 1991; Hamrick y Godt, 1990; Ranker, 1994; Lewis y Crawford, 1995). Estos resultados van en contra de lo esperado teóricamente por lo que resulta interesante la exploración de hipótesis alternativas. Fenómenos tales como procesos de especiación recientes, cambios recientes en los patrones de distribución geográfica (Karron *et al.*, 1988), múltiples efectos de colonización (Ranker, 1994) o refugios del Pleistoceno (Lewis y Crawford, 1995) han sido planteados en la literatura. De esto, podemos concluir que el re-análisis de los patrones

de variación genética con otros marcadores moleculares puede cambiar las interpretaciones de las posibles causas del origen de especies raras o endémicas restringidas, que a su vez pueden tener implicaciones importantes para fines de conservación.

Métodos de análisis

Al analizar los datos obtenidos con RAPDs se deben tener en cuenta dos supuestos importantes: 1) cada uno de los marcadores representa un locus mendeliano en el cual el marcador visible, el alelo dominante, está en equilibrio de Hardy Weinberg con un alelo recesivo y 2) los alelos marcados para diferentes loci no comigran a la misma posición en el gel (Lynch y Milligan, 1994). A pesar de que los heterocigos no pueden ser detectados directamente con los RAPDs, es posible estimar parámetros de la estructura poblacional. Sin embargo, el poder estadístico de estas estimaciones es reducido en comparación a los sistemas codominantes. Pero se pueden obtener estimadores de la diversidad genética cuando nuestras interpretaciones incluyen un cuidadoso seguimiento de los supuestos y se utilizan sólo los loci con las frecuencias alélicas recomendadas por Lynch y Milligan (1994). Algunos trabajos que muestran la aplicación de estos métodos son Aagaard *et al.* (1995), Friar *et al.* (1996) y Smith y Pham (1996).

Un análisis molecular de varianza (AMOVA) de las frecuencias de las bandas puede asignar la estructura genética de poblaciones diploides en equilibrio Hardy-Weinberg o con un nivel alto de autofecundación (Stewart y Excoffier, 1996). Este método estima índices de fijación similares a los obtenidos con datos codominantes comparables a los estimadores obtenidos con enzimas usando el método de Weir y Cockerham (1984) y con datos moleculares de RFLPs, secuencias de ADN o microsatélites (Excoffier *et al.*, 1992).

Una alternativa para estimar la diversidad genética sin la suposición de un equilibrio Hardy-Weinberg es considerar la diversidad fenotípica de las bandas de cada individuo como un genotipo distinto y estimar las similitudes y diferencias con base en las mismas (Huff *et al.*, 1993; Whitkus *et al.*, 1997).

Para estudios de diferenciación y relaciones genéticas se utilizan medidas de similitud y de diferencias. La distancia genética puede estimarse como el número de diferencias dividido entre el total de comparaciones. Esto bajo el supuesto de que hay un gran número de loci marcados aleatoriamente por los RAPDs distribuidos a lo largo del genoma, de tal forma que la proporción de diferencias encontradas para estos loci será una buena medida de las diferencias entre los genomas.

Cuadro 6. Estudios de introgresión, segregación y flujo génico en donde se han utilizado los RAPDs como marcadores moleculares.

Familia	Especie	Objetivo	Nivel de organización	Referencia
Agavaceae	<i>Agave schottii</i>	Niveles de entrecruzamiento	Poblaciones clonales	Trame <i>et al.</i> (1995)
Annonaceae	<i>Annona cherimolla</i>	Segregación	Población	Ronning <i>et al.</i> (1995a)
Asteraceae	<i>Helianthus annuus</i> , <i>H. petiolaris</i> y <i>H. anomalus</i>	Introgresión	Híbridos interespecíficos	Rieseberg <i>et al.</i> (1995)
Betulaceae	<i>H. annuus</i> y <i>H. petiolaris</i>	Introgresión	Híbridos interespecíficos	Rieseberg <i>et al.</i> (1996)
	<i>Betula alleghaniensis</i>	Segregación	Población	Roy <i>et al.</i> (1992)
Cruciferae	<i>B. pendula</i>	Segregación y parentesco	Individuos	Akerman <i>et al.</i> (1995)
	<i>Brassica napus</i> y <i>B. campestris</i>	Introgresión	Híbridos interespecíficos	Marshall <i>et al.</i> (1994)
	<i>B. napus</i> y <i>B. campestris</i>	Introgresión	Híbridos interespecíficos	Mikkelsen <i>et al.</i> (1996)
	<i>B. carinata</i>	Introgresión	Híbridos somáticos	Mukhopadhyay <i>et al.</i> (1994)
	<i>B. napus</i> y <i>B. juncea</i> <i>B. oleracea</i>	Introgresión Segregación	Híbridos interespecíficos Variedades (progenie doble-haploide)	Frello <i>et al.</i> (1995) Kearsey <i>et al.</i> (1996)
Datisceae	<i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i> <i>Datisca glomerata</i>	Niveles de endogamia Niveles de entrecruzamiento	Cultivares (híbridos F1) Poblaciones	Boury <i>et al.</i> (1992) Fritsch y Rieseberg (1992)
	Ericaceae	<i>Vaccinium darrowi</i> y <i>V. corymbosum</i>	Introgresión	Híbridos interespecíficos
Gramineae	<i>V. macrocarpon</i>	Segregación	Progenie F1	Novy y Vorsa (1996)
	<i>Pennisetum</i> spp.	Segregación e introgresión	Especies	Gustine <i>et al.</i> (1996)
	<i>Poa pratensis</i>	Segregación y niveles de entrecruzamiento	Población	Huif y Bara (1993)
	<i>T. aestivum</i>	Introgresión	Progenie F3	Francis <i>et al.</i> (1995)
	<i>T. aestivum</i>	Introgresión	Especie	Iqbal y RayLynn (1995)
	<i>T. aestivum</i>	Introgresión	Híbridos	King <i>et al.</i> (1993)
	<i>T. spelta</i>	Introgresión	Líneas isogénicas cercanas (progenie F2)	Schachermayer <i>et al.</i> (1995)
<i>T. aestivum</i> y <i>Secale cereale</i>	Introgresión	Especies	Koebner y Martin (1994)	

Los estimadores de distancia genética utilizados son el índice de Jaccard (Vierling y Nguyen, 1992), el índice de diversidad de Shannon (Russell *et al.*, 1993) coeficiente de similitud de Dice (Hilu y Stalker, 1995) y la distancia genética de Rogers (Wilkie *et al.*, 1993), de Nei (Aagaard *et al.*, 1995) y la de Nei y Li (Stewart y Porter, 1995). Debido a que existen varias razones posibles para la ausencia de un fragmento, el uso de coeficientes que omitan la consideración de datos negativos (*e.g.*, Jaccard o Dice) pueden ser más apropiados.

Las distancias genéticas pueden ser utilizadas para un análisis de clusters (UPGMA) y/o para un análisis de componentes principales para revelar las afinidades genéticas.

Ventajas y desventajas de los RAPDs como marcadores moleculares

Para el uso de los RAPDs es importante considerar sus ventajas y desventajas con respecto a otros marcadores moleculares. En secciones anteriores ya se han mencionado algunos problemas conceptuales concernientes a la interpretación de los resultados de los fragmentos de los RAPDs (*e.g.*, homología de caracteres).

La electroforesis de enzimas es económica, rápida y los protocolos son relativamente sencillos. Sin embargo, diferentes tejidos o muestras congeladas durante diferentes periodos y bajo diferentes condiciones en ocasiones presentan diferentes patrones de bandedo, así como muestras colectadas en diferentes

LOS RAPDs COMO MARCADORES MOLECULARES

Familia	Especie	Objetivo	Nivel de organización	Referencia
Leguminosae	<i>Zea mays</i>	Introgresión	Especies	Gourmet y Rayburn (1996)
	<i>Z. mays</i>	Segregación	Población (segregación en 2 generaciones)	Heun y Helentjaris (1993)
	<i>Arachis hypogaea</i> y <i>A. cardenasii</i>	Introgresión	Híbridos interespecíficos	García <i>et al.</i> (1995)
	<i>Arachis</i> spp.	Introgresión	Progenie F2	García <i>et al.</i> (1996)
	<i>Gliricidia</i> spp.	Flujo génico	Interespecífico	Dawson <i>et al.</i> (1996)
Moraceae Pinaceae	<i>Medicago sativa</i>	Niveles de entrecruzamiento	Individuos	Gjuric y Smith (1996)
	<i>Humulus lupulus</i>	Segregación	Progenie F1	Pillay y Kenny (1996)
	<i>Picea abies</i>	Segregación	Población	Bucci & Menozzi (1993)
	<i>P. glauca</i> y <i>Pseudotsuga menziesii</i>	Segregación	Progenie F1	Carlson <i>et al.</i> (1993)
	<i>Pinus sylvestris</i>	Segregación	Progenie F1 (tejido haploide y diploide)	Lu <i>et al.</i> (1995)
Rosaceae	<i>Pseudotsuga menziesii</i>	Segregación	Población (tres generaciones)	Jermstad <i>et al.</i> (1994)
	<i>Malus floribunda</i> y <i>M. domestica</i>	Introgresión	Especie	Durham y Korban (1994)
	<i>Malus</i> spp.	Parentesco	Cultivares	Gardiner <i>et al.</i> (1996)
Rutaceae	<i>Prunus persica</i>	Segregación	Población	Pooler y Scorza (1995)
	<i>Coffea arabica</i> y <i>C. canephora</i>	Introgresión	Especie	Orozco-Castillo <i>et al.</i> (1994)
Solanaceae	<i>Solanum tuberosum</i> y <i>S. bulbocastanum</i>	Introgresión	Híbridos somáticos	Masuelli <i>et al.</i> (1995)
	<i>S. tuberosum</i> y <i>S. phureja</i>	Introgresión	Híbridos interespecíficos	Waugh <i>et al.</i> (1992)
	<i>Solanum</i> spp.	Segregación	Híbridos interespecíficos	Quiros <i>et al.</i> (1993)
	<i>Theobroma cacao</i>	Segregación	Cultivares	Ronning <i>et al.</i> (1995b)
Umbeliferae	<i>Allium</i> spp.	Introgresión	Especies	van Raamsdonk <i>et al.</i> (1997)

estaciones pueden también mostrar una expresión diferencial de ciertas enzimas. Si se siguen procedimientos adecuados de colecta y de congelado la mayoría de estos problemas pueden ser controlados. El mayor factor limitante de las enzimas es el bajo nivel de variabilidad que detectan. Esto reduce su utilidad sobre todo a nivel intrapoblacional (*e.g.*, Amos y Hoelzel, 1992). Los RAPDs detectan una gran variación, además el análisis directo del ADN es comparable entre tejidos, no presenta variabilidad estacional y requiere de pequeñas cantidades de ADN.

Los marcadores de ADN ofrecen una mayor resolución y flexibilidad que la electroforesis de enzimas, además se pueden combinar diferentes técnicas. El principal factor limitante de estos marcadores son el

tiempo y el costo. Algunas de las ventajas que presentan los RAPDs sobre otros marcadores moleculares como los RFLPs y minisatélites, son el que es un método relativamente fácil, que no requiere de un conocimiento previo de la secuencia de ADN, no requieren de la construcción o el mantenimiento de una librería genómica, el número de loci que pueden ser examinados es ilimitado y no requieren de pruebas radiactivas (Reiter *et al.*, 1992; Whitkus *et al.*, 1994). Además, los RAPDs revelan altos niveles de polimorfismo dentro y entre poblaciones de especies en comparación con los niveles detectados con RFLPs o isoenzimas (van Heusden y Bachmann, 1992a, b).

A continuación se describen brevemente algunos casos que muestran la eficiencia de los RAPDs como

Cuadro 7. Estudios en los que se han utilizado los RAPDs como marcadores moleculares para establecer diferenciación y relaciones genéticas entre cultivares y/o variedades.

Familia	Especie	Nivel de organización	Referencia
Amaranthaceae	<i>Amaranthus</i> spp.	Cultivares	Transue <i>et al.</i> (1994)
Anacardiaceae	<i>Pistacia vera</i>	Cultivares	Hormaza <i>et al.</i> (1994a)
Araliaceae	<i>Panax quinquefolius</i>	Cultivares	Bai <i>et al.</i> (1997)
Asteraceae	<i>Cynara scolymus</i>	Cultivares	Tivang <i>et al.</i> (1996)
	<i>Microseris douglasii</i>	Poblaciones	Roelofs y Bachmann (1995)
	<i>M. pygmaea</i>	Poblaciones	van Heusden y Bachmann (1992a, b) y van Heuten <i>et al.</i> (1994)
Caryophyllaceae	<i>Silene latifolia</i>	Cultivares y Razas	Vellekoop <i>et al.</i> (1996)
Convolvulaceae	<i>Ipomea batatas</i>	Cultivares	Connolly <i>et al.</i> (1994)
Cruciferae	<i>Brassica juncea</i>	Cultivares	Jain <i>et al.</i> (1994)
	<i>B. napus</i>	Cultivares	Mailier <i>et al.</i> (1994)
	<i>B. oleracea</i> var. <i>capitata</i>	Cultivares	Phippen <i>et al.</i> (1997)
	<i>B. oleracea</i>	Varietades	Dos Santos <i>et al.</i> (1994)
	<i>Capsella bursa-pastoris</i>	Poblaciones	Neuffer (1996)
Cucurbitaceae	<i>Citrullus lanatus</i>	Cultivares	Lee <i>et al.</i> (1996)
Ericaceae	<i>Vaccinium macrocarpon</i>	Varietades	Novy <i>et al.</i> (1994)
	<i>V. macrocarpon</i>	Cultivares	Novi y Vorsa (1995)
Euphorbiaceae	<i>Manihot esculenta</i>	Cultivares	Marmey <i>et al.</i> (1993)
	<i>Euphorbia pulcherrima</i>	Cultivares	Ling <i>et al.</i> (1997)
Gramineae	<i>Avena sterilis</i>	Cultivares	Heun <i>et al.</i> (1994)
	<i>Buchloe dactyloides</i>	Cultivares	Wu y Lin (1994)
	<i>Echinochloa</i> spp.	Cultivares	Hilu (1994)
	<i>Hordeum vulgare</i>	Cultivares	Ordon <i>et al.</i> (1997)
	<i>Lolium perene</i>	Cultivares	Huff (1997)
	<i>Oriza sativa</i>	Varietades	Xiao <i>et al.</i> (1996)
	<i>O. sativa</i>	Cultivares	Yu y Nguyen (1994), Virk <i>et al.</i> (1995), Mackill (1995) y Loarce <i>et al.</i> (1996)
	<i>O. sativa</i>	Poblaciones	Suh <i>et al.</i> (1997)
	<i>Panicum</i> spp.	Especies	M'Ribu y Hilu (1994)
	<i>P. virgatum</i>	Poblaciones	Gunter <i>et al.</i> (1996)
	<i>Poa pratensis</i>	Cultivares	Huff y Bara (1993)
	<i>Sacharum</i> spp.	Especies	Huckett y Botha (1995)
	<i>Sorghum bicolor</i>	Líneas puras	Vierling <i>et al.</i> (1994)
	<i>Triticum aestivum</i> , <i>Hordeum vulgare</i> y <i>Avena sativa</i>	Cultivares	Dweikat <i>et al.</i> (1993)
	<i>T. aestivum</i>	Varietades	Joshi y Nguyen (1993)
<i>T. aestivum</i>	Cultivares	Mercado <i>et al.</i> (1996)	
<i>T. monococcum</i> y <i>T. urartu</i>	Cultivares	Vierling y Nguyen (1992)	
<i>T. urartu</i>	Poblaciones	Castagna <i>et al.</i> (1997)	
Leguminosae	<i>Cajanus cajan</i>	Cultivares y poblaciones	Ratnaparkhe <i>et al.</i> (1995)
	<i>Chamaecytisus proliferus</i> ssp. <i>palmensis</i>	Poblaciones	Francisco-Ortega <i>et al.</i> (1993)
	<i>Glicicidia sepium</i> y <i>G. maculata</i>	Poblaciones	Dawson <i>et al.</i> (1996)
	<i>Glycine max.</i>	Poblaciones	Heims <i>et al.</i> (1997)
	<i>Lens</i> spp.	Cultivares	Abu-elwaia <i>et al.</i> (1995) y Ahmad <i>et al.</i> (1996)
	<i>Lens</i> spp.	Poblaciones	Sharma <i>et al.</i> (1995)
	<i>Lolium</i> spp. y <i>Festuca</i> spp.	Especies	Wiesner <i>et al.</i> (1995)
	<i>Mangifera indica</i>	Cultivares	Schnell <i>et al.</i> (1995)
	<i>Medicago truncatula</i>	Poblaciones	Bonnin <i>et al.</i> (1996)
	<i>Phaseolus lunatus</i>	Cultivares	Nienhuis <i>et al.</i> (1995)

Familia	Especie	Nivel de organización	Referencia
	<i>P. vulgaris</i>	Cultivares	Johns <i>et al.</i> (1997)
	<i>P. vulgaris</i>	Genotipos	Skroch y Nienhuis (1995 a)
	<i>Pisum sativum</i>	Cultivares	Samec y Nasinec (1995 y 1996)
	<i>Pisum</i> spp.	Cultivares	Lu <i>et al.</i> (1996)
	<i>Trifolium pratense</i>	Cultivares	Kongkiatngam <i>et al.</i> (1996)
	<i>Trifolium</i> spp.	Poblaciones	Bullita (1995)
	<i>Vicia faba</i>	Cultivares	Link <i>et al.</i> (1995)
Liliaceae	<i>Alstroemia</i> sp.	Cultivares	Dubouzet <i>et al.</i> (1997)
Malvaceae	<i>Gossypium hirsutum</i> y <i>G. barbadense</i>	Cultivares	Multani v Lyon (1995)
	<i>G. hirsutum</i> , <i>G. barbadense</i>	Cultivares y híbridos interespecíficos	Tafarani <i>et al.</i> (1996)
	<i>G. hirsutum</i> , y <i>G. arboreum</i>	Varietades	Iqbal <i>et al.</i> (1997)
	<i>Iliamna corei</i> e <i>Iliamna remota</i>	Poblaciones e Genets	Steward y Porter (1995)
Moraceae	<i>Ficus carica</i>	Cultivares	Khadari <i>et al.</i> (1995)
	<i>Humulus lupulus</i>	Cultivares	Pillay y Kenny (1996)
Musaceae	<i>Musa</i> spp.	Poblaciones	Bhat <i>et al.</i> (1995)
Myrtaceae	<i>Eucalyptus globulus</i>	Cultivares	Nesbitt <i>et al.</i> (1995)
	<i>E. risdonii</i> y <i>E. amygdalina</i>	Especies y híbridos interespecíficos	Sale <i>et al.</i> (1996)
Myrtaceae	<i>Eucalyptus</i> spp.	Genets	Keil y Griffin (1994)
Paimae	<i>Elaeis guineensis</i>	Cultivares	Shah <i>et al.</i> (1994)
Pinaceae	<i>Picea abies</i>	Poblaciones	Scheepers <i>et al.</i> (1997)
Polygonaceae	<i>Fagopyrum esculentum</i>	Poblaciones	Kump y Javornik (1996)
Rosaceae	<i>Fragaria</i> sp.	Cultivares	Parent y Page (1995)
	<i>Fragaria X ananassa</i>	Cultivares	Graham <i>et al.</i> (1996)
	<i>Malus domestica</i>	Cultivares	Gardiner <i>et al.</i> (1996)
	<i>Malus</i> spp.	Cultivares	Harada <i>et al.</i> (1993)
	<i>Malus</i> spp.	Poblaciones	Dunemann <i>et al.</i> (1994)
	<i>Margyraena skottsbergii</i>	Híbridos	Crawford <i>et al.</i> (1993)
	<i>Prunus persica</i>	Cultivares	Warburton y Bliss (1996)
	<i>Prunus</i> spp.	Cultivares	Ortiz <i>et al.</i> (1997)
	<i>Ribes nigrum</i>	Cultivares	Lanham <i>et al.</i> (1995)
Rubiaceae	<i>Rubus</i> spp.	Especies	Graham y McNicol (1995)
	<i>Coffea arabica</i>	Poblaciones	Lashermes <i>et al.</i> (1996)
	<i>Coffea</i> spp.	Varietades y especies	Orozco-Castillo <i>et al.</i> (1994)
Rutaceae	<i>Citrus deliciosa</i>	Cultivares	Machado <i>et al.</i> (1996)
Salicaceae	<i>Populus</i> spp.	Genets	Castiglione <i>et al.</i> (1993)
	<i>P. tremuloides</i>	Poblaciones	Yeh <i>et al.</i> (1995)
Solanaceae	<i>Solanum melongena</i>	Poblaciones	Karihaloo <i>et al.</i> (1995)
	<i>S. chaucha</i>	Cultivares	Cisneros y Quiros (1993)
	<i>S. tuberosum</i>	Cultivares	Hosaka <i>et al.</i> (1994)
Sterculariaceae	<i>Theobroma cacao</i>	Cultivares	Russel <i>et al.</i> (1993)
	<i>T. cacao</i> ssp. <i>cacao</i>	Poblaciones	y N'Goran <i>et al.</i> (1994)
		Poblaciones	de la Cruz <i>et al.</i> (1995)
Triticaceae	Varias especies	Especies	Wei y Wang (1995)
Umbelacaceae	<i>Allium sativum</i>	Cultivares	Maaß y Klaas (1995)
Umbelacaceae	<i>Allium</i> spp.	Cultivares	Wilkie <i>et al.</i> (1993)
Vitaceae	<i>Vitis</i> spp.	Cultivares	Qu <i>et al.</i> (1996)

Cuadro 8. Estudios de relaciones filogenéticas en donde se han utilizado los RAPDs como marcadores moleculares.

Familia	Especies	Referencia
Caryophyllaceae	<i>Silene</i> spp.	Oxelman (1996)
Chenopodiaceae	<i>Beta</i> spp.	Shen <i>et al.</i> (1996)
Cruciferae	<i>Brassica</i> spp. y <i>Raphanus sativus</i>	Thormann <i>et al.</i> (1994)
Cupresaceae	<i>Juniperus excelsa</i> y <i>J. procera</i>	Adams <i>et al.</i> (1993)
	<i>Juniperus</i> spp.	Adams y Demeke (1993)
	<i>Juniperus</i> spp.	Adams (1994)
Geraniaceae	<i>Pelargonium</i> spp.	Renou <i>et al.</i> (1997)
Gramineae	<i>Brachypodium</i> spp.	Catalán <i>et al.</i> (1995)
	<i>Hordeum</i> spp.	Marillia y Scoles (1996)
Leguminosae	<i>Arachis</i> spp.	Hilu y Stalker (1995)
	<i>Cassia</i> , <i>Senna</i> y <i>Chamaecrista</i>	Whitty <i>et al.</i> (1994)
	<i>Lens</i> spp.	Abo-elwafa <i>et al.</i> (1995)
	<i>Lens</i> spp.	Ahmad <i>et al.</i> (1996)
	<i>Lens</i> spp.	Ahmad y McNeil (1996)
	<i>Lens</i> spp.	Sharma <i>et al.</i> (1996)
	<i>Leucaena</i> spp.	Harris (1995)
	<i>Lolium</i> spp. y <i>Festuca</i> spp.	Stammers <i>et al.</i> (1995)
	<i>Lotus</i> spp.	Campos <i>et al.</i> (1994)
	<i>Pisum</i> spp.	Hoey <i>et al.</i> (1996)
	<i>Trifolium</i> spp.	Bullita (1995)
	<i>Vigna</i> spp.	Kaga <i>et al.</i> (1996 b)
Liliaceae	<i>Asphodelus</i> spp.	Díaz-Lifante y Aguinagalde (1995)
	<i>Syringa</i> spp.	Marsolais <i>et al.</i> (1993)
Meliaceae	8 especies y 4 generos	Chalmers <i>et al.</i> (1994)
Pinaceae	<i>Abies</i> spp.	Vicario <i>et al.</i> (1995)
	<i>Pinus</i> spp.	Furman <i>et al.</i> (1997)
Rosaceae	<i>Malus</i> spp.	Landry <i>et al.</i> (1994)
	<i>Rhododendron</i> spp.	Iqbal <i>et al.</i> (1995)
	<i>Rosa</i> spp.	Millan <i>et al.</i> (1996)
Salicaceae	<i>Populus</i> spp.	Castiglione <i>et al.</i> (1993)
Scrofulariaceae	<i>Paulownia fortunei</i> , <i>P. kawakamii</i> y <i>P. taiwaniana</i>	Wang <i>et al.</i> (1994)
Umbelacaceae	<i>Allium</i> spp.	van Raamsdonk <i>et al.</i> (1997)
	<i>Allium</i> spp.	Wilkie <i>et al.</i> (1993)

marcadores moleculares. Por ejemplo, Reiter *et al.* (1992) construyeron un mapa genético de *Arabidopsis thaliana* usando RAPDs con poco esfuerzo; con dos trabajadores de tiempo completo en sólo 4 meses, marcaron y mapearon 225 loci. Además, calcularon la eficiencia de mapeo para sus poblaciones y encontraron que los marcadores dominantes pueden ser tan eficientes como los codominantes (e.g., RFLPs) cuando se usan poblaciones recombinantes. Un caso similar, se ha reportado para una especie de pino en donde Chaparro *et al.* (1992 citado en Tingey *et al.*, 1992) crearon 191 marcadores RAPDs en 6 meses facilitando con esto el mapeo genético en esta especie arbórea.

Los problemas prácticos detectados con los RAPDs son la presencia de bandas erróneas o artefactos, la replicabilidad de los resultados y la comigración de

bandas. A menudo se pueden producir múltiples fragmentos de RAPDs al amplificar ADN genómico con un sólo oligonucleótido; sin un análisis genético formal no es posible determinar si dos bandas en el fenotipo de los RAPDs representan dos loci o si son dos alelos distintos de un sólo locus (Whitkus *et al.*, 1994).

En algunos ensayos con RAPDs se ha encontrado que existe "competencia" entre los fragmentos de estos marcadores (Williams *et al.*, 1993). Se ha observado que los productos finales de la reacción están determinados por competencia entre sustratos, más que por el número total de sitios potencialmente disponibles a menos de que ocurra un apareamiento perfecto entre la muestra de ADN bajo estudio y el oligonucleótido (Heun y Heentjaris 1993; Haldén *et al.*, 1996). Esto subestima los fragmentos homólogos porque la

presencia o ausencia de una banda particular de RAPDs pudo darse por competencia con otro fragmento polimórfico más que por un cambio en el sitio de acoplamiento del oligonucleótido (Rieseberg, 1996).

La mayoría de los oligonucleótidos tienen un alto contenido de GC (50-80%; Bowditch *et al.*, 1993). Este alto contenido de GC implica que las temperaturas de alineación deben ser bajas, dando la posibilidad de alineaciones imperfectas. Para evitar la presencia de bandas erróneas o artefactos provocadas por una alineación no específica es importante verificar que el contenido de GC de los oligonucleótidos no sea elevado (no más del 60%), trabajar con la mayor temperatura de alineación posible (alrededor de 36 °C) y después de la alineación, elevar la temperatura por unos segundos (54 °C) para evitar anneaciones del oligonucleótido con segmentos que no son 100% homólogos. Aunque se ha estimado que existe un error del 5-10% intrínseco en la repetibilidad de los fenotipos en la técnica de los RAPDs (Weeden *et al.*, 1992), la repetibilidad y confiabilidad de los resultados puede obtenerse si se establecen de manera precisa cada una de las condiciones, tanto de la reacción de amplificación como de la electroforesis.

El problema casi infanqueable de esta técnica para algunas aplicaciones es que la mayoría de los loci son dominantes, por lo tanto los RAPDs dan menos información genética por locus que los marcadores codominantes. Trabajando con organismos clonales o con poblaciones con un alto grado de autofecundidad la dominancia obviamente no presenta ningún problema (Carlson, 1991; Bucci y Menozzi, 1993; Bonnin *et al.*, 1996).

Comentarios finales y perspectivas

Modificaciones al procedimiento estándar de los RAPDs han sido propuestos. Por ejemplo, la utilización de dos oligonucleótidos en lugar de uno amplifica nuevas bandas distintas (no-homólogas) a las generadas en reacciones con un sólo oligonucleótido, lo cual indica que fueron amplificados en regiones distintas del genoma (Hu *et al.*, 1995a). Esta modificación junto con la síntesis de oligonucleótidos más largos (por ejemplo, de 24 bases "24mers") amplifica los fragmentos de RAPDs de manera más específica y confiable. Estos marcadores fueron denominados SCARs ("Sequence Characterized Amplified Regions") por Paran y Michelmore (1992). Otra alternativa es el uso de un par de oligonucleótidos que puedan amplificar sitios específicos de un alelo en un locus de interés en un fragmento de ADN. Este método fue denominado ASAPs ("Allele-Specific Associated Primers") (Gu *et al.*, 1995). Otro método alternativo es

el conocidos como STS ("Sequence-Tagged-Site") (ver Talbert *et al.*, 1994).

Nuevas técnicas basadas en el uso del PCR para DNA fingerprinting se han desarrollado. Uno de ellos es el llamado AFLPs (ver Simpson 1997 este número) los cuales han revelado niveles significativos de polimorfismo al nivel de ADN (Vos *et al.*, 1995). Los primeros estudios utilizando esta técnica han mostrado que los AFLPs son marcadores moleculares robustos y confiables (Becker *et al.*, 1995; Meksen *et al.*, 1995; Paul *et al.*, 1997).

El uso de los métodos de PCR incluyendo los RAPDs y sus modificaciones han sido muy importantes en el estudio de diversos problemas de biología evolutiva y sus aplicaciones en diferentes campos. Sin embargo, es notorio que la mayoría de los estudios se han hecho con plantas cultivadas por lo que en el futuro será necesario realizar más estudios en especies de ecosistemas naturales.

Literatura Citada

- Aagaard J.E., Vollmer S.S., Sorensen F.C. y Strauss S.H. 1995. Mitochondrial DNA products among RAPD profiles are frequent and strongly differentiated between races of Douglas-fir. *Molecular Ecology* 4:441-447
- Abo-Elwafa A., Murai K. y Shimada T. 1995. Intra- and inter-specific variations in *Lens* revealed by RAPD markers. *Theoretical and Applied Genetics* 90:335-340.
- Adam-Blondon A.F., Sévignac M., Bannerot H. y Dron M. 1994. SCAR, RAPD and RFLP markers linked to a dominant gene (*Arel*) conferring resistance to anthracnose in common bean. *Theoretical and Applied Genetics* 88:865-870.
- Adams R.P. 1994. Geographic variation and systematics of monosperous *Juniperus* (Cupressaceae) from the Chihuahua desert based on RAPDs and terpenes. *Biochemical Systematics and Ecology* 22:698-710.
- Adams R.P. y Demeke T. 1993. Systematic relationships in *Juniperus* based on random amplified polymorphic DNAs RAPDs. *Taxon* 42:553-571
- Adams, R.P., Demeke T. y Abulfatih H.A. 1993. RAPD DNA fingerprints and terpenoids: clues to past migrations of *Juniperus* in Arabia and east Africa. *Theoretical and Applied Genetics* 87:22-26.
- Ahmad M. y McNeil D.L. 1996. Comparison of crossability, RAPD, SDS-PAGE and morphological markers for revealing genetic relationships within and among *Lens* species. *Theoretical and Applied Genetics* 93:788-793.
- Ahmad M., McNeil D.L., Fautrier A.G., Armstrong K.F. y Paterson A.M. 1996. Genetic relationships in *Lens* species and parentage determination of their interspecific hybrids using RAPD markers. *Theoretical and Applied Genetics* 92:1091-1095
- Akerman S., Tammissola J., Lapinjoki S.P., Soderlund H., Kauppinen V., Vihera-Aarnio A., Regina M. y Hagqvist

- R. 1995. RAPD markers in parentage confirmation of a valuable breeding progeny of European white birch. *Canadian Journal of Forest Research* 25:1070-1076.
- Al-Janabi S.M., Honeycutt R.J. y Sobral B.W.S. 1994. Chromosome assortment in *Saccharum*. *Theoretical and Applied Genetics* 89:959-963.
- Amarger V. y Mercier L. 1995. Molecular analysis of RAPD DNA based markers: Their potential use for the detection of genetic variability in jojoba (*Simmondsia chinensis* L. Schneider). *Biochimie* 12:931-936.
- Amos B. y Hoelzel R. 1992. Applications of molecular genetic techniques to the conservation of small populations. *Biological Conservation* 61:133-144.
- Anastassopoulos E. y Keil M. 1996. Assessment of natural and induced genetic variation in *Alstroemeria* using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *Euphytica* 90:235-244.
- Antonovics J. y Levin D.A. 1980. The ecological and genetic consequences of density-dependent regulations in plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* 11:411-452.
- Backeljau T., De Bruyn L., De Wolf H., Jordaens K., van Dongen S., Verhagen R. y Winnepenninckx B. 1995. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) and parsimony methods. *Cladistics* 11:119-130.
- Bai D., Brandle J. y Reeleder R. 1997. Genetic diversity in North American ginseng (*Panax quinquefolius* L.) grown in Ontario detected by RAPD analysis. *Genome* 40:111-115.
- Bai D., Reeleder R. y Brandle J.E. 1995. Identification of two RAPD markers tightly linked to the *Nicotiana debneyi* gene for resistance to black root rot of tobacco. *Theoretical and Applied Genetics* 91:1184-1189.
- Baird E., Cooper-Bland S., Waugh R., de Maine M. and Powell W. 1992. Molecular characterization of inter- and intra-specific somatic hybrids of potato using randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *Molecular and General Genetics* 233:469-475.
- Barcaccia G., Tavoletti S., Pezzotti M., Falcinelli M. y Veronesi F. 1994. Fingerprinting of alfalfa meiotic mutants using RAPD markers. *Euphytica* 80:19-25.
- Barcaccia G., Tosti N., Falistocco E. y Veronesi F. 1995. Cytological, morphological and molecular analyses of controlled progenies from meiotic mutants of alfalfa producing unreduced gametes. *Theoretical and Applied Genetics* 91:1008-1015.
- Barua U.M., Chalmers K.J., Hackett C.A., Thomas W.T.B., Powel W. y Waugh R. 1993. Identification of RAPD markers linked to a *Rhynchosporium secalis* resistance locus in barley using near-isogenic lines and bulked segregant analysis. *Heredity* 71:177-184.
- Beaumont V.H., Mantet J., Rocheford T.R. y Widholm J.M. 1996. Comparison of RAPD and RFLP markers for mapping F_2 generations in maize (*Zea mays* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 93:606-612.
- Bennet H., Guries R.P., Boury S. y Smalley E.B. 1995. Identification of RAPD markers linked to a black leaf spot resistance gene in Chinese elm. *Theoretical and Applied Genetics* 90:1068-1073.
- Bhat K.V., Jarret R.L. y Rana R.S. 1995. DNA profiling of banana and plantain cultivars using random amplified polymorphic DNA (RAPD) and restriction fragment length polymorphism (RFLP) markers. *Electrophoresis* 16:1736-1745.
- Binelli G. y Bucci G. 1994. A genetic linkage map of *Picea abies* Karst., based on RAPD markers, as a tool in population genetics. *Theoretical and Applied Genetics* 88:283-288.
- Bogani P., Simoni A., Lio P., Scialpi A. y Buatti M. 1996. Genome flux in tomato cell clones cultured in vitro in different physiological equilibria. II. A RAPD analysis of variability. *Genome* 39:846-853.
- Bonnin I., Huguet T., Gherardi M., Proserpi J.M., y Olivieri I. 1996. High level of polymorphism and spatial structure in a selfing plant species, *Medicago truncatula* (Leguminosae), shown using RAPD markers. *American Journal of Botany* 83:843-855.
- Boury S., Lutz Y., Gavalda M.C., Guidet F. y Schelsser A. 1992. Genetic fingerprinting in cauliflower by the RAPD method and determination of the level of inbreeding in a set of F_2 seeds. *Agronomie* 12:669-681.
- Bowditch B.M., Albright D.G., Williams J.G.K. y Braun M.J. 1993. Use of randomly amplified polymorphic DNA markers in comparative genome studies. *Methods Enzymology* 224:294-309.
- Bradshaw Jr H.D., Villar M., Watson B.D., Otto K.G., Stewart S. y Stetler R.F. 1994. Molecular genetics of growth and development in *Populus*. III. A genetic linkage map of a hybrid poplar composed of RFLP, STS, and RAPD markers. *Theoretical and Applied Genetics* 89:167-178.
- Brady J.L., Scott N.S., y Thomas M.R. 1996. DNA typing of hops (*Humulus lupulus*) through application of RAPD and microsatellite marker sequences converted to sequence tagged sites (STS). *Euphytica* 91:277-284.
- Brauner S., Crawford D.J. y Stuessy T.F. 1992. Ribosomal DNA and RAPD variation in the rare plant family Lactoridaceae. *American Journal of Botany* 79:1436-1439.
- Bucci G. y Menozzi P. 1993. Segregation analysis of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers in *Picea abies* Karst. *Molecular Ecology* 2:227-232.
- Bucci G. y Menozzi P. 1995. Genetic variation of RAPD markers in a *Picea abies* Karst. population. *Heredity* 75:188-197.
- Bullita S. 1995. Development of RAPD markers of potential taxonomic use in the genus *Trifolium*. *Journal of Genetics and Breeding* 49:313-318.
- Byrne M., Murrell J.C., Allen B. y Moran G.F. 1995. An integrated linkage map for eucalypts using RFLP, RAPD and isozyme markers. *Theoretical and Applied Genetics* 91:869-875.
- Caetano-Anolles G., Bassam G.J. y Gresshoff P.M. 1991. High resolution DNA amplification fingerprinting using very

- short arbitrary oligonucleotide primers. *Biotechnology* 9:553-556.
- Cai Q., Guy C.L. y Moore G.A. 1994. Extension of the linkage map in Citrus using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers and RFLP mapping of cold-acclimation-responsive loci. *Theoretical and Applied Genetics* 89:606-614.
- Camargo L.E.A., Savides L., Jung G., Nienhuis J. y Osborn T.C. 1997. Location of the self-incompatibility locus in an RFLP and RAPD map of *Brassica oleracea*. *Journal of Heredity* 88:57-60.
- Campos L.P., Raelson J.V. y Grant W.F. 1994. Genome relationships among *Lotus* species based on random amplified polymorphic DNA (RAPD). *Theoretical and Applied Genetics* 88:417-422.
- Carlson J.E., Tulsieram L.K., Glaubitz J.C., Luk V.W.K., Kauriainen C. y Kautsuge K. 1991. Segregation of random amplified DNA markers in F_2 progeny of conifers. *Theoretical and Applied Genetics* 83:194-200.
- Castagna R., Gnocchi S., Perenzin M. y Heun M. 1997. Genetic variability of the wild diploid wheat *Triticum urartu* revealed by RFLP and RAPD markers. *Theoretical and Applied Genetics* 94:424-430.
- Castiglione S., Wang G., Damiani G., Bandi C., Bisoffi S. y Sala F. 1993. RAPD fingerprints for identification and for taxonomic studies of elite poplar (*Populus* spp.) clones. *Theoretical and Applied Genetics* 87:54-59.
- Catalán P., Shi Y., Armstrong L., Draper J. y Stace C.A. 1995. Molecular phylogeny of the grass genus *Brachypodium* P. Beauv. based on RFLP and RAPD analysis. *Botanical Journal of the Linnean Society* 117:263-280.
- Chagué V., Mercier J.C., Guénard M., de Coursel A. y Vedel F. 1996. Identification and mapping on chromosome 9 of RAPD markers linked to *Su-5* in tomato by bulked segregant analysis. *Theoretical and Applied Genetics* 92:1045-1051.
- Chalmers K., Barua U.M., Hackett C.A., Thomas W.T.B., Waugh R. y Powell W. 1993. Identification of RAPD markers linked to genetic factors controlling the milling energy requirement of barley. *Theoretical and Applied Genetics* 87:314-320.
- Chalmers K., Newton A.C., Waugh R., Wilson J. y Powell W. 1994. Evaluation of the extent of genetic variation in mahoganies (Meliaceae) using RAPD markers. *Theoretical and Applied Genetics* 89:504-508.
- Chalmers K., Waugh R., Sprent J.L., Simons A.J. y Powell W. 1992. Detection of genetic variation between and within populations of *Gliricidia sepium* and *Gliricidia maculata* using RAPD markers. *Heredity* 69:465-472.
- Chaparro J.X., Werner D.J., O'Malley D. y Sederoff R.R. 1994. Targeted mapping and linkage analysis of morphological isozyme, and RAPD markers in peach. *Theoretical and Applied Genetics* 87:805-815.
- Chittenden L.M., Schertz K.F., Lin Y.-R., Wing R.A. y Patterson A.H. 1994. A detailed RFLP map of *Sorghum bicolor* X *S. propinquum*, suitable for high-density mapping, suggests ancestral duplication of Sorghum chromosomes or chromosomal segments. *Theoretical and Applied Genetics* 87:925-933.
- Chong D.K.X., Yang R.-C. y Yeh F.C. 1994. Nucleotide divergence between populations of trembling aspen (*Populus tremuloides*) estimated with RAPDs. *Current Genetics* 26:374-376.
- Chunwongse J., Bunn T.B., Crossman C., Jiang J. y Tanksley S.D. 1994. Chromosomal localization and molecular-marker tagging of the powdery mildew resistance gene (*Lr*) in tomato. *Theoretical and Applied Genetics* 89:76-79.
- Cipriani G., di Bella R. y Testolin R. 1996. Screening RAPD primers for molecular taxonomy and cultivar fingerprinting in the genus *Actinidia*. *Euphytica* 90:169-174.
- Cisneros P.L. y Quiros C.F. 1995. Variation and phylogeny of the triploid cultivated potato *Solanum chaucha* Juz. et Buk. based on RAPD and isozyme markers. *Genetic Resources and Crop Evolution* 42:373-386.
- Connolly A.G., Godwin I.D., Cooper M. y DeLacy I.H. 1994. Interpretation of random amplified polymorphic DNA marker data for fingerprinting sweet potato (*Ipomea batatas* L.) genotypes. *Theoretical and Applied Genetics* 88:332-336.
- Corniquel B. y Mercier L. 1994. Date palm (*Phoenix dactylifera*) cultivar identification by RFLP and RAPD. *Plant Science* 101:163-172.
- Crawford D.J. y Lee N.S. 1992. Electrophoretic and RAPD divergence between disjunct species and populations of flowering plants in North America and Asia. *American Journal of Botany* 79:6-7.
- Crawford D.J., Brauner S., Cosner M.B. y Stuessy T.F. 1993. Use of RAPD markers to document the origin of the intergeneric hybrid *X Margyacaena skottsbergii*, Rosaceae on the Juan Fernández Islands. *American Journal of Botany* 80:89-92.
- Crawford D.J., Wiens D. y Haines D.W. 1991. The Lactoridaceae on the Juan Fernández Islands: enzyme electrophoresis, and new observations on number and sizes of populations. *American Journal of Botany* 78:176.
- Dawson I.K., Simons A.J., Waugh R. y Powell W. 1996. Detection and pattern of interspecific hybridization between *Gliricidia sepium* and *G. maculata* in Meso-America revealed by PCR-based assays. *Molecular Ecology* 5:89-98.
- Dax E., Livneh O., Edelbaum O., Kedár N., Gavish N., Karchi H., Milo J., Sela Y. y Rabinowitch H.D. 1993. A random amplified polymorphic DNA (RAPD) molecular marker for the *Tm-2-a* gene in tomato. *Euphytica* 74:159-163.
- de Filippis L., Hoffman E. y Hampf R. 1996. Identification of somatic hybrids of tobacco generated by electrofusion and culture of protoplasts using RAPD-PCR. *Plant Science* 121:39-46.
- de la Cruz M., Whitkus R., Gómez-Pompa A. y Mota-Bravo L. 1995. Origins of cacao cultivation. *Nature* 375:542-543.

- Delourme R., Bouchereau A., Hubert N., Renard M. y Landry B.S. 1994. Identification of RAPD markers linked to a fertility restorer gene for the Ogora radish cytoplasmic male sterility of rapeseed (*Brassica napus* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 88:741-748.
- Deng Z.N., Gentile A., Nicolosi E., Domina F., Vardi A. y Tribulato E. 1995. Identification *in vivo* and *in vitro* lemon mutants by RAPD markers. *Journal of Horticultural Science* 70:117-125.
- Devey M.E., Bell J.C., Smith D.N., Neale D.B. y Moran G.F. 1996. A genetic linkage map for *Pinus radiata* based on RFLP, RAPD, and microsatellite markers. *Theoretical and Applied Genetics* 92:673-679.
- Díaz-Lifante Z. y Aguinagalde Y. 1996. The use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers for the study of taxonomical relationships among species of *Asphodelus* sect. *Verinea* (Asphodelaceae). *American Journal of Botany* 83:949-953.
- Dülewanger E., Pascal T., Zuger C. y Kervella J. 1996. Analysis of molecular markers associated with powdery mildew resistance genes in peach (*Prunus persica* (L.) Batsch) X *Prunus davidiana* hybrids. *Theoretical and Applied Genetics* 93:909-919.
- dos Santos J.B., Nienhuis J., Krocho P., Tivang J. y Slocum M.K. 1994. Comparison of RAPD and RFLP genetic markers in determining genetic similarity among *Brassica oleracea* L. genotypes. *Theoretical and Applied Genetics* 87:909-915.
- Dubouzet J.G., Murata N. y Shinoda, K. 1997. RAPD analysis of genetic relationships among *Astroemeria* L. cultivars. *Scientia Horticulturae* 68:181-189.
- Dunemann F., Kahnau R. y Schmith H. 1994. Genetic relationships in *Malus* evaluated by RAPD 'fingerprinting' of cultivars and wild species. *Plant Breeding* 113:150-159.
- Durham R.E. y Korban S.S. 1994. Evidence of gene introgression in apple using RAPD markers. *Euphytica* 79:109-114.
- Dweikat I., Ohm H., Patterson F. y Cambron, S. 1997. Identification of RAPD markers for 11 Hessian fly resistance genes in wheat. *Theoretical and Applied Genetics* 94:419-423.
- Dweikat Y., Mackenzie S., Levy M. y Ohm H. 1993. Pedigree assessment using RAPD-DGGE in cereal crop species. *Theoretical and Applied Genetics* 85:497-505.
- Dweikat Y., Ohm H., Mackenzie S., Patterson F., Cambron S. y Ratchliffe R. 1994. Association of a DNA marker with Hessian fly resistance gene *H9* in wheat. *Theoretical and Applied Genetics* 89:964-968.
- Eriksson O. y Bremer B. 1993. Genet dynamics of the clonal plant *Rubus saxatilis*. *Journal of Ecology* 81:533-542.
- Erlich H.A. y Arheim N. 1992. Genetic analysis using polymerase chain reaction. *Annual Review of Genetics* 26:479-506.
- Excoffier L., Smouse P.E. y Quattro J.M. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131:479-491.
- Fauré S., Nover J.L., Horry J.P., Bakry F., Lanaud C. y González de León D. 1993. A molecular marker-based linkage map of diploid bananas (*Musa acuminata*). *Theoretical and Applied Genetics* 87:517-526.
- Foisset N., Delourme R., Barret P. y Renard M. 1995. Molecular tagging of the dwarf *BREIZH* (*Bzh*) gene in *Brassica napus*. *Theoretical and Applied Genetics* 91:756-761.
- Foisset N., Delourme R., Barret P., Hubert N., Landry B.S. y Renard M. 1996. Molecular-mapping analysis in *Brassica napus* using isozyme, RAPD and RFLP markers on a doubled-haploid progeny. *Theoretical and Applied Genetics* 93:1017-1025.
- Foolad M.R., Jones R.A. y Rodríguez R.L. 1993. RAPD markers or constructing intraspecific tomato genetic maps. *Plant Cell Reports* 12:293-297.
- Francis H.A., Leitch A.R. y Koebner R.M.D. 1995. Conversion of a RAPD-generated PCR product containing a novel dispersed repetitive element into a fast and robust assay for the presence of rye chromatin in wheat. *Theoretical and Applied Genetics* 90:636-642.
- Francisco-Ortega J., Newbury H.J. y Ford-Lloyd B.V. 1993. Numerical analyses of RAPD data highlight the origin of cultivated tagasaste (*Chamaecytisus profliferus* ssp. *palmensis*) in the Canary Islands. *Theoretical and Applied Genetics* 87:264-270.
- Frello S., Hansen K.R., Jensen J. y Jorgensen R.B. 1995. Inheritance of rapeseed (*Brassica napus*)-specific RAPD markers and a transgene in the cross *B. juncea* X (*B. napus* X *B. napus*). *Theoretical and Applied Genetics* 91:236-241.
- Freyre R., Warnke S., Sosinski B. y Douches D.S. 1994. Quantitative trait locus analysis of tuber dormancy in diploid potato (*Solanum* spp.). *Theoretical and Applied Genetics* 89:474-480.
- Friar E.A., Robichaux R.H. y Mount D.W. 1996. Molecular genetic variation following a population crash in the endangered Mauna Kea silversword, *Argyroxiphium sandwicense* ssp. *sandwicense* (Asteraceae). *Molecular Ecology* 5:687-691.
- Fritsch P. y Rieseberg L.H. 1992. High outcrossing rates maintain male and hermaphrodite individuals in populations of the flowering plant *Datisca glomerata*. *Nature* 359:633-636.
- Fukuoka S., Hosaka K. y Kamijima O. 1992. Use of random amplified polymorphic DNAs (RAPDs) for identification of rice accessions. *Japanese Journal of Genetics* 67:243-252.
- Furman B.J., Grattapaglia D., Dvorak W.S. y O'Malley D.M. 1997. Analysis of genetic relationships of Central American and Mexican pines using RAPD markers that distinguish species. *Molecular Ecology* 6:321-331.
- Gallego F. J., Martínez I. 1996. Molecular typing of rose cultivars using RAPDs. *Journal of Horticultural Science* 71:901-908.
- Gambier R.M. y Mulcahy D.L. 1996. The association between pollen size and Renner complex in *Oenothera villanicae* and *O. purpurea* ssp. *purpurea* and their hybrids: evidence

- for preanthesis pollen competition. *Theoretical and Applied Genetics* 92:140-144.
- García G.M., Stalker H.T. y Kochert G. 1995. Introgression analysis of an interspecific hybrid population in peanuts (*Arachis hypogaea* L.) using RFLP and RAPD markers. *Genome* 38:166-176.
- García G.M., Stalker H.T., Shroeder E. y Kochert, G. 1996. Identification of RAPD, SCAR and RFLP markers tightly linked to nematode resistance genes introgressed from *Arachis cardenasii* into *Arachis hypogaea*. *Genome* 39:836-845.
- Gardiner S.E., Bassett H.C.M., Madie C., Noiton D.A.M. 1996. Isozyme, randomly amplified polymorphic DNA (RAPD), and restriction fragment-length polymorphism (RFLP) markers used to deduce a putative parent for the 'Braeburn' apple. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 121:996-1001.
- Gavidia I., Agudo L.D. y Pérez-Bermúdez P. 1996. Selection and long-term cultures of high-yielding Digitalis obscura plants: RAPD markers for analysis or genetic stability. *Plant Science* 121:197-205.
- Gidoni D., Rom M., Kunik T., Zur M., Izsak E., Izhar S. y Firon N. 1994. Strawberry-cultivar identification using randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *Plant Breeding* 113:339-342.
- Giese H., Holm-Jensen A.G., Mathiasen H., Kjaer B., Rasmussen S.K., Bay H. y Jensen J. 1994. Distribution of RAPD markers on a linkage map of barley. *Heredity* 120:267-273.
- Gjuric R. y Smith S.R.Jr. 1996. Identification of cross-pollinated and self-pollinated progeny in alfalfa through RAPD nulliplex loci analysis. *Crop Science* 36:389-393.
- Gogorcena Y. y Parfitt D.E. 1994. Evaluation of RAPD marker consistency for detection of polymorphism in apricot. *Scientia Horticulturae* 59:163-167.
- Golembiewski R.C., Danneberger T.K. y Sweeney P.M. 1997. Potential of RAPD markers for use in the identification of creeping bentgrass cultivars. *Crop Science* 37:212-214.
- Gourmet C. y Rayburn A.L. 1996. Identification of RAPD markers associated with the presence of B chromosomes in maize. *Heredity* 77:240-244.
- Graham J. y McNicol R.J. 1995. An examination of the ability of RAPD markers to determine the relationships within and between *Rubus* species. *Theoretical and Applied Genetics* 90:1128-1132.
- Graham J., McNicol R.J. y McNicol J.W. 1996. A comparison of methods for the estimation of genetic diversity in strawberry cultivars. *Theoretical and Applied Genetics* 93:402-406.
- Grandillo S. y Tanksley S.D. 1996. Genetic analysis of RFLPs, GATA microsatellites and RAPDs in a cross between *L. esculentum* and *L. pimpinellifolium*. *Theoretical and Applied Genetics* 92:957-965.
- Grattapaglia D., Bertolucci F.L.G., Penchel R. y Sederoff R.R. 1995. Genetic mapping of QTLs controlling vegetative propagation in *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla* using a pseudo-testcross strategy and RAPD markers. *Theoretical and Applied Genetics* 90:933-947.
- Grattapaglia D., Bertolucci F.L.G., Penchel R. y Sederoff R.R. 1996a. Genetic mapping of quantitative trait loci controlling growth and wood quality traits in *Eucalyptus grandis* using a maternal half-sib family and RAPD markers. *Genetics* 144:1205-1214.
- Grattapaglia D., Silva C.C.E. y Nassar N.M.A. 1996b. Strict maternal inheritance of RAPD fingerprints confirms apomixis in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Canadian Journal of Plant Science* 76:379-382.
- Gu W.K., Weeden N.F. y Wallace D.H. 1995. Large-scale, cost effective screening of PCR products in market-assisted selection applications. *Theoretical and Applied Genetics* 91:465-470.
- Gunter L.E., Tuskan G.A. y Wulschlegler S.D. 1996. Diversity among populations of switchgrass based on RAPD markers. *Crop Science* 36:1017-1022.
- Gustafsson L. y Gustafsson P. 1994. Low genetic variation in Swedish populations of the rare species *Vicia psiformis* (Fabaceae) revealed with RFLP (rDNA) and RAPD. *Plant Systematics and Evolution* 189:133-148.
- Gustine D.L., Sherwood R.T., Gounaris Y. y Huff D. 1996. Isozyme, protein, and RAPD markers within a half-sib family of buffelgrass segregating for apospory. *Crop Science* 36:723-727.
- Haley S.D., Afanador L. y Kelly J.D. 1994a. Selection for monogenic pest resistance traits with coupling- and repulsion-phase RAPD markers. *Crop Science* 34:1061-1066.
- Haley S.D., Afanador L., Miklas P.N., Stavely J.R. y Kelly J.D. 1994b. Heterogeneous inbred populations are useful as sources of near-isogenic lines for RAPD marker localization. *Theoretical and Applied Genetics* 88:337-342.
- Haley S.D., Miklas P.N., Afanador L. y Kelly J.D. 1994c. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) marker variability between and within gene pools of common bean. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 119:122-125.
- Haley S.D., Miklas P.N., Stavely J.R., Byrum J. y Kelly J.D. 1995. Identification of RAPD markers linked to a major rust resistance gene block in common bean. *Theoretical and Applied Genetics* 86:503-512.
- Hallén C., Hansen M., Nilsson N.-O. y Hjerdin A. 1996. Competition as source of errors in RAPD analysis. *Theoretical and Applied Genetics* 93:1185-1192.
- Hallén C., Nilsson N.-O., Rading L.M. y Säll T. 1994. Evaluation of RFLP and RAPD markers in a comparison of *Brassica napus* breeding lines. *Theoretical and Applied Genetics* 88:123-128.
- Hamada K. y Hagimori M. 1996. RAPD-based method for cultivar-identification of calla lily (*Zantedeschia* spp.). *Scientia Horticulturae* 65:215-218.
- Hamrick J.L. y Godt M.J.W. 1990. Allozyme diversity in plant species. En: Brown A.D.H., Clegg M.T., Kahler A.L. y Weir

- B.S. (Edrs.). *Plant population genetics, breeding, and germoplasm resources*. Smuauer, Sunderland, MA, 43-63.
- Harada K., Kinoshita A., Shukor N.A.A., Tachida H. y Yamazaki T. 1994. Genetic variation estimated in three *Shorea* species by the RAPD analysis. *Japanese Journal of Genetics* 69:713-718.
- Harada T., Matsukawa K., Sato T., Ishikawa R., Niizeki M. y Saito K. 1993. DNA-RAPDs detect genetic variation and paternity in *Malus*. *Euphytica* 65:87-91.
- Harris S.A. 1995. Systematics and randomly amplified polymorphic DNA in the genus *Leucaena* (Leguminosae, Mimosoideae). *Plant Systematics and Evolution* 197:195-208.
- Hashizume T., Shimamoto I., Harushima Y., Yui M., Sato T., Imai T. y Hirai M. 1996. Construction of a linkage map for watermelon (*Citullus lanatus* (Thunb.) Matsum. and Nakai) using random amplified polymorphic DNA (RAPD). *Euphytica* 90:265-273.
- Heinze B. y Schmidt J. 1995. Monitoring genetic fidelity vs. somaclonal variation in Norway spruce (*Picea abies*) somatic embryogenesis by RAPD analysis. *Euphytica* 85:341-345.
- Helms T., Orf J., Vallad G. y McClean P. 1997. Genetic variance, coefficient of parentage, and genetic distance of six soybean populations. *Theoretical and Applied Genetics* 94:20-26.
- Heun M. y Helentjaris T. 1993. Inheritance of RAPDs in F₁ hybrids of corn. *Theoretical and Applied Genetics* 85:961-968.
- Heun M., Murphy J.P. y Phillips T.D. 1994. A comparison of RAPD and isozyme analyses for determining the genetic relationships among *Avena sterilis* L. accessions. *Theoretical and Applied Genetics* 87:689-696.
- Hilu K.W. 1994. Evidence from RAPD markers in the evolution of *Echinochloa* millets (Poaceae). *Plant Systematics and Evolution* 139:247-257.
- Hilu K.W. y Stalker H.T. 1995. Genetic relationships between peanut and wild species of *Arachis* sect. *Arachis* (Fabaceae): evidence from RAPDs. *Plant Systematics and Evolution* 198:167-178.
- Hoev B.K., Crowe K.R., Jones V.M. y Polans N.O. 1996. A phylogenetic analysis of *Psium* based on morphological characters, and allozyme and RAPD markers. *Theoretical and Applied Genetics* 92:92-100.
- Hombergen E.J. y Bachmann K. 1995. RAPD mapping of three QTLs determining trichome formation in *Microrhiza* hybrid H27 (Asteraceae: Lactuceae). *Theoretical and Applied Genetics* 90:853-858.
- Hormaza J.I., Dollo L. y Polito V.S. 1994a. Determination of relatedness and geographical movements of *Pistacia vera* (Pistachio, Anacardiaceae) germoplasm by RAPD analysis. *Economic Botany* 48:349-358.
- Hormaza J.I., Dollo L. y Polito V.S. 1994b. Identification of a RAPD marker linked to sex determination in *Pistacia vera* using bulked segregant analysis. *Theoretical and Applied Genetics* 89:9-13.
- Hosaka K., Mori M. y Ogawa K. 1994. Genetic relationships of Japanese potato cultivars assessed by RAPD analysis. *American Potato Journal* 71:535-546.
- Hu J., Quiros C., Atus P., Struss D. y Robbelen G. 1995. Mapping of a gene determining linoleic acid concentration in rapeseed with DNA-based markers. *Theoretical and Applied Genetics* 90:258-262.
- Huckett B.I. y Botha F.C. 1995. Stability and potential use of RAPD markers in a sugarcane genealogy. *Euphytica* 86:117-125.
- Huff D.R. 1997. RAPD characterization of heterogeneous perennial ryegrass cultivars. *Crop Science* 37:557-561.
- Huff D.R. y Bara J.M. 1993. Determining genetic origins of aberrant progeny from facultative apomictic Kentucky bluegrass using a combination of flow cytometry and silver-stained RAPD markers. *Theoretical and Applied Genetics* 87:201-208.
- Huff D.R., Prakash R. y Smouse P.E. 1993. RAPD variation within and among natural populations of outcrossing buffalograss (*Buchloe dactyloides* (Nutt.) Engelm.). *Theoretical and Applied Genetics* 86:927-934.
- Hutchings M.J. 1979. Weight-density relationships in ramet populations of clonal perennial plants, with special reference to the 3/2 power law. *Journal of Ecology* 67:21-33.
- Inai S., Ishikawa K., Nunomura O. y Ikehashi H. 1993. Genetic analysis of stunted growth by nuclear-cytoplasmic interaction in interspecific hybrids of *Capsicum* by using RAPD markers. *Theoretical and Applied Genetics* 87:416-422.
- Iqbal M.J. y Rayburn A.L. 1994. Stability of RAPD markers for determining cultivar specific DNA profiles in rye (*Secale cereale* L.). *Euphytica* 75:215-220.
- Iqbal M.J. y Rayburn A.L. 1995. Identification of the 1RS rye chromosomal segment in wheat by RAPD analysis. *Theoretical and Applied Genetics* 91:1048-1053.
- Iqbal M.J., Aziz N., Saeed N.A., Zatar Y. y Malik K.A. 1997. Genetic diversity evaluation of some elite cotton varieties by RAPD analysis. *Theoretical and Applied Genetics* 94:139-144.
- Iqbal M.J., Paden D.W. y Rayburn A.L. 1995. Assessment of genetic relationships among *Rhododendron* species, varieties and hybrids by RAPD analysis. *Scientia Horticulturae* 63:215-223.
- Isabel N., Tremblay L., Michaud M., Tremblay F.M. y Bousquet J. 1993. RAPDs as an aid to evaluate the genetic integrity of somatic embryogenesis-derived populations of *Picea mariana* Mill. B.S.P. *Theoretical and Applied Genetics* 86:81-87.
- Jain A., Bharti S., Banga S.S., Prakash S. y Lakshmi Anaran M. 1994. Potential use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) technique to study the genetic diversity in Indian mustard (*Brassica juncea*) and its relationship to heterosis. *Theoretical and Applied Genetics* 88:116-122.
- Jermstad K.D., Reem A.M., Heniffin J.R., Wheeler N.C. y Neale D.B. 1994. Inheritance of restriction fragment

- length polymorphisms and random amplified polymorphic DNAs in coastal Douglas-fir. *Theoretical and Applied Genetics* **89**:758-766.
- Jiang C., Lewis M.E. y Sink K.C. 1997. Combined RAPD and RFLP molecular linkage map of asparagus. *Genome* **40**: 69-76.
- Jianhua Z., McDonald M.B., Sweeney P.M. 1996a. Random amplified polymorphic DNA (RAPDs) from seeds of differing soybean and maize genotypes. *Seed Science and Technology* **24**:513-522.
- Jianhua Z., McDonald M.B., Sweeney P.M. 1996b. Soybean cultivar identification using RAPD. *Seed Science and Technology* **24**:589-592.
- Johas M.A., Skroch P.W., Nienhuis J., Hinrichsen P., Bascur G. y Munoz-Schnick C. 1997. Gene pool classification of common bean landraces from Chile based on RAPD and morphological data. *Crop Science* **37**:605-613.
- Johnson E., Miklas P.N., Stavely J.R. y Martínez-Cruzado J.C. 1995. Coupling- and repulsion-phase RAPDs for marker-assisted selection of PI 181996 rust resistance in common bean. *Theoretical and Applied Genetics* **90**:659-664.
- Joshi C.P. y Nguyen H.T. 1993. RAPD (random amplified polymorphic DNA) analysis based intervarietal genetic relationships among hexaploid wheats. *Plant Science* **93**:95-103.
- Kaendler C., Fladung M. y Uhrig H. 1996. Production and identification of somatic hybrids between *Solanum tuberosum* and *S. papita* by using the *101C* gene as a morphological selectable marker. *Theoretical and Applied Genetics* **92**:455-462.
- Kaga A., Hosaka K., Kimura T., Misso S. y Kamijima O. 1993. Application of random amplified polymorphic DNA RAPD analysis for azuki bean and its related genera. *Science Reports of Faculty of Agriculture Kobe University* **20**:171-176.
- Kaga A., Ohnishi M., Ishii T. y Kamijima O. 1996. A genetic linkage map of azuki bean constructed with molecular and morphological markers using an interspecific population (*Vigna angularis* X *V. nakashimae*). *Theoretical and Applied Genetics* **93**:658-663.
- Kaga A., Tomooka N., Egawa Y., Hosaka K. y Kamijima, O. 1996. Species relationships in the subgenus *Ceratropis* (genus *Vigna*) as revealed by RAPD analysis. *Euphytica* **88**:17-24.
- Karihaloo J.L., Brauner S. y Gotthieb L.D. 1995. Random amplified polymorphic DNA variation in the eggplant, *Solanum melongena* L. (Solanaceae). *Theoretical and Applied Genetics* **90**:767-770.
- Karron J.D. 1987. A comparison of levels of genetic polymorphism and self-compatibility in geographically restricted and widespread plant congeners. *Evolutionary Ecology* **1**:47-58.
- Karron J.D. 1991. Patterns of genetic variation and breeding systems in rare plant species. En: Falk D.A. y Holsinger K.E. (Eds.). *Genetics and conservation of rare plants*. Oxford University Press, New York, 87-98.
- Kawchuk L.M., Lynch D.R., Hachev J., Bains P.S. y Kulevar F. 1994. Identification of a codominant amplified polymorphic DNA marker linked to the verticillium wilt resistance gene in tomato. *Theoretical and Applied Genetics* **89**:661-664.
- Kaya Z. y Neale D.B. 1995. Utility of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers for linkage mapping in Turkish red pine (*Pinus brutia* Ten.). *Silvae Genetica* **44**:110-116.
- Keasey M.J., Ramsay L.D., Jennings D.E., Lydiate D.J., Bohuon E.J.R. y Marshall D.F. 1996. Higher recombination frequencies in female compared to male meiosis in *Brassica oleracea*. *Theoretical and Applied Genetics* **92**:363-367.
- Keil M. y Griffin A.R. 1994. Use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers in the discrimination and verification of genotypes in Eucalyptus. *Theoretical and Applied Genetics* **89**:442-450.
- Kennard W.C., Poetter K., Dijkhuizen A., Meglic V., Staub J.E. y Havey M.J. 1994. Linkages among RFLP, RAPD, isozyme, disease-resistance, and morphological markers in narrow and wide crosses of cucumber. *Theoretical and Applied Genetics* **89**:42-48.
- Khadari B., Lashermes P. y Kjellberg F. 1995. RAPD fingerprints for identification and genetic characterization of fig (*Ficus carica* L.) genotypes. *Journal of Genetics and Breeding* **49**:77-85.
- Khasa P.D. y Danek B.P. 1996. Rapid identification of white-Engelmann spruce species by RAPD markers. *Theoretical and Applied Genetics* **92**:46-52.
- King I.P., Purdie K.A., Rezanoor H.N., Koebner R.M.D., Miller T.E., Reader S.M. y Nicholson P. 1993. Characterization of *Thinopyrum besababicum* chromosome segments in wheat using random amplified polymorphic DNAs (RAPDs) and genomic in situ hybridization. *Theoretical and Applied Genetics* **86**:895-900.
- Klein-Lankhorst R.M., Vennunt A., Weide R., Lithaska T. y Zabel P. 1991. Isolation of Molecular markers for tomato (*L. esculentum*) using random amplified polymorphic DNA (RAPD). *Theoretical and Applied Genetics* **83**:108-114.
- Ko H.L., Henry R.J., Beal P.R., Moisaner J.A. y Fisher K.A. 1996. Distinction of *Ozothamnus diosmifolius* (Vent.) DC genotypes using RAPD. *Hortscience* **31**:858-861.
- Koebner R.M.D. y Martin P.K. 1994. RAPDs as molecular markers for detection of the presence of 17c chromosomes in wheat. *Journal of Genetics and Breeding* **48**:85-88.
- Koller B., Lehmann A., McDermott J.M. y Gessler C. 1993. Identification of apple cultivars using RAPD markers. *Theoretical and Applied Genetics* **85**:901-904.
- Kongkiatgam P., Waterway M.J., Coulman B.E. y Fortin M.G. 1996. Genetic variation among cultivars of red clover (*Trifolium pratense* L.) detected by RAPD markers amplified from bulk genomic DNA. *Euphytica* **89**:355-361.

- Kongkiatngam P., Waterway M.J., Fortin M.G. y Coulman B.E. 1995. Genetic variation within and between two cultivars of red clover (*Trifolium pratense* L.): Comparisons of morphological, isozyme, and RAPD markers. *Euphytica* 84:237-246.
- Kubisiak T.L., Nelson C.D., Nance W.L. y Stine M. 1995. RAPD linkage mapping in a longleaf pine X slash pine F_1 family. *Theoretical and Applied Genetics* 90:1119-1127.
- Kump B. y Javornik B. 1996. Evaluation of genetic variability among common buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) populations by RAPD markers. *Plant Science* 114:149-178.
- Kutcher H.R., Blevy K.L., Rossnagel B.G. y Legge W.G. 1996. Identification of RAPD markers for common root rot and spot blotch (*Cochliobolus sativus*) resistance in barley. *Genome* 39:206-215.
- Lanaud C., Risterucci A.M., N'Goran A.K.J., Clement D., Flament M.H., Laurent V. y Falque M. 1995. A genetic linkage map of *Theobroma cacao* L. *Theoretical and Applied Genetics* 91:987-993.
- Lande R. y Barrowclough G.F. 1987. Effective population size, genetic variation and their use in population management. En: Soulé M.E. (Ed.) *Viable population: for conservation*. Cambridge University Press, Cambridge. pp. 87-123.
- Lande R. 1988. Genetics and demography in biological conservation. *Science* 241:1455-1460.
- Landry B.S., Li R.Q., Cheung W.Y. y Granger R.L. 1994. Phylogenetic analysis of 25 apple rootstocks using RAPD markers and actual gene tagging. *Theoretical and Applied Genetics* 89:847-852.
- Lanham P.G., Brennan R.M., Hackett C. y McNicol R.J. 1995. RAPD fingerprinting of blackcurrant (*Ribes nigrum* L.) cultivars. *Theoretical and Applied Genetics* 90:66-172.
- Lashermes P., Trouslot P., Anthony F., Combes M.C. y Charrier A. 1996. Genetic diversity for RAPD markers between cultivated and wild accessions of *Coffea arabica*. *Euphytica* 87:59-64.
- Lawson W.R., Goulter K.C., Henry R.J., Kong G.A. y Kochman J.K. 1996. RAPD markers for a sunflower rust resistance gene. *Australian Journal of Agricultural Research* 47:395-401.
- Lee S.J., Shi J.S., Park K.W. y Hong Y.P. 1996. Detection of genetic diversity using RAPD-PCR and sugar analysis in watermelon (*Citrullus lanatus* (Thunb.) Mansl.) germoplasm. *Theoretical and Applied Genetics* 92:719-725.
- Lehner A., Campbell M.A., Wheeler N.C., Pöykkö T., Glössl J., Kreike J. y Neale D.B. 1995. Identification of a RAPD marker linked to the pendula gene in Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst. f. *pendula*). *Theoretical and Applied Genetics* 91:1092-1094.
- Levi A. y Rowland L.J. 1997. Identifying blueberry cultivars and evaluating their genetic relationships using randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) and simple sequence repeat- (SSR) anchored primers. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 122:74-78.
- Lewis P.O. y Snow A.A. 1992. Deterministic paternity exclusion using RAPD markers. *Molecular Ecology* 1:155-160.
- Li S., Zhang Z., Wang B., Zhong Z. y Yao J. 1995. Tagging the *Pm4a* gene in NILs by RAPD analysis. *Acta Genetica Sinica* 22:103-108.
- Lin B.-Y. y Chou H.-P. 1997. Physical mapping of four RAPDs in the B chromosome of maize. *Theoretical and Applied Genetics* 94:534-538.
- Lin D., Hubbes M. Y Zsuffa L. 1994. Differentiation of polar and willow clones using RAPD fingerprints. *Tree Physiology* 14:1097-1105.
- Lin J.-Z. y Ritland K. 1996. Construction of a genetic linkage map in the wild plant *Mimulus* using RAPD and isozyme markers. *Genome* 39:63-70.
- Ling J.-T., Sauve R. y Gawel, N. 1997. Identification of Poinsettia cultivars using RAPD markers. *Hortscience* 32:122-124.
- Link W., Dixkens C., Singh M., Schwall M. y Melchinger A.E. 1995. Genetic diversity in European and Mediterranean faba bean germ plasm revealed by RAPD markers. *Theoretical and Applied Genetics* 90:27-32.
- Liu C.J. 1996. Genetic diversity and relationships among Lablab purpureus genotypes evaluated using RAPD as markers. *Euphytica* 90:115-119.
- Liu Z. y Fournier G.R. 1993. Comparison of allozyme, RFLP, and RAPD markers for revealing genetic variation within and between trembling aspen and bigtooth aspen. *Theoretical and Applied Genetics* 87:97-105.
- Loarce Y., Gallego R. y Ferrer, E. 1996. A comparative analysis of the genetic relationships between rye cultivars using RFLP and RAPD markers. *Euphytica* 88:107-115.
- Lorenz M., Weihe A. y Böerner T. 1994. DNA fragments of organellar origin in random amplified polymorphic DNA (RAPD) patterns of sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 88:775-779.
- Lorenz M., Weihe A. y Böerner T. 1997. Cloning and sequencing of RAPD fragments amplified from mitochondrial DNA of male-sterile and male-fertile cytoplasm of sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 94:273-278.
- Lu J., Knox M.R., Ambrose M.J., Brown J.K.M. y Ellis T.H.N. 1996. Comparative analysis of genetic diversity in peaches by RFLP and PCR-based methods. *Theoretical and Applied Genetics* 93:1103-1111.
- Lu M.-Z., Szmidt A.E. y Wang X.-R. 1995. Inheritance of RAPD fragments in haploid and diploid tissues of *Pinus sylvestris* (L.). *Heredity* 74:582-589.
- Lu Z.-X., Reighard G.L., Baird W.V., Abbott A.G. y Rajapakse S. 1996. Identification of peach rootstock cultivars by RAPD markers. *Hortscience* 31:127-129.
- Lubbers E.L., Arthur L., Hanna W.W. y Ozias-Akins P. 1994. Molecular markers shared by diverse apomictic *Pennisetum* species. *Theoretical and Applied Genetics* 89:636-642.

- Luque T., Ruiz C., Avalos J., Calderón I.L. y Figueroa M.E. 1995. Detection and analysis of genetic variation in Salicorniaceae (Chenopodiaceae) using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *Taxon* 44:53-63.
- Lynch M. y Milligan B.G. 1994. Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Molecular Ecology* 3:91-99.
- M'Ribu H.K. y Hilu K.W. 1994. Detection of interspecific and intraspecific variation in *Panicum* millets through random amplified polymorphic DNA. *Theoretical and Applied Genetics* 88:412-416.
- Maab H.I. y Klaas M. 1995. Intraspecific differentiation of garlic (*Allium sativum* L.) by isozyme and RAPD markers. *Theoretical and Applied Genetics* 91:89-97.
- Machado M.A., Coletta H.D., Targon M.L.R.N. y Pompreu J. Jr. 1996. Genetic relationship of Mediterranean mandarin (Citrus deliciosa Tenore) using RAPD markers. *Euphytica* 92:321-326.
- Mackill D.J. 1993. Classifying japonica rice cultivars with RAPD markers. *Crop Science* 33:889-894.
- Mahé A., Bannerot H. y Grisvard J. 1995. Construction of near-isogenic lines to investigate the efficiency of different resistance genes to anthracnose. *Theoretical and Applied Genetics* 90:859-864.
- Mailer R.J., Scarth R. y Fristensky B. 1994. Discrimination among cultivars of rapeseed (*Brassica napus* L.) using DNA polymorphisms amplified from arbitrary primers. *Theoretical and Applied Genetics* 87:697-704.
- Maisonneuve B., Bellec Y., Anderson P. y Michelmore R.W. 1994. Rapid mapping of two genes for resistance to downy mildew from *Lactuca serriola* to existing clusters of resistance genes. *Theoretical and Applied Genetics* 89:96-104.
- Marillia E.F. y Scoles G.J. 1996. The use of RAPD markers in *Hordeum* phylogeny. *Genome* 39:646-654.
- Marinev P., Beeching J.R., Hamon S. y Charrier A. 1993. Evaluation of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) germplasm collections using RAPD markers. *Euphytica* 74:203-209.
- Marshall P., Marchand M.-C., Lisieczko Z. y Landry B.S. 1994. A simple method to estimate the percentage of hybridity in canola (*Brassica napus*) F₁ hybrids. *Theoretical and Applied Genetics* 89:853-858.
- Marsolais J.V., Pringle J.S. y White B.N. 1993. Assessment of random amplified polymorphic DNA RAPD is genetic markers for determining the origin of interspecific Liliac hybrids. *Taxon* 42:531-537.
- Martín C. y Pérez C. 1994. The use of RAPD to determine the genetic variability of micropropagated plants from endangered species. Application to the Spanish endemism, *Limonium estevei*. *Phyton* 56:65-72.
- Martín C., Juliano A., Newbury H.J., Lu B.-R., Jackson M.T. y Ford-Lloyd B.V. 1997. The use of RAPD markers to facilitate the identification of *Oryza* species within a germplasm collection. *Genetic Resources and Crop Evolution* 44:175-183.
- Masulli R.W., Tanimoto E.Y., Brown C.R. y Comai L. 1995. Irregular meiosis in a somatic hybrid between *S. bulbocastanum* and *S. tuberosum* detected by species-specific PCR markers and cytological analysis. *Theoretical and Applied Genetics* 91:401-408.
- Maughan P.J., Saghai Marroff M.A. y Buss G.R. 1996. Molecular-marker analysis of seed-weight: genomic locations, gene action, and evidence for orthologous evolution among three legume species. *Theoretical and Applied Genetics* 93:574-579.
- Menkir A., Goldsbrough P. y Fieira G. 1997. RAPD based assessment of genetic diversity in cultivated lines of sorghum. *Crop Science* 37:564-568.
- Mercado L.A., Souza E. y Kowarik D. 1996. Origin and diversity of North American hard spring wheats. *Theoretical and Applied Genetics* 93 597-599.
- Michelmore R.W., Paran I. y Kesseli V. 1991. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 88:9828-9832.
- Mikkelsen T.R., Jensen J. y Jørgensen R.B. 1996. Inheritance of oilseed rape (*Brassica napus*) RAPD markers in a backcross progeny with *Brassica campestris*. *Theoretical and Applied Genetics* 92 492-497.
- Miklas P.N., Afanador I. y Kells J.D. 1996. Recombination-facilitated RAPD marker-assisted selection for disease resistance in common bean. *Crop Science* 36:86-90.
- Millan T., Osuna F., Cobos S., Torres A.M., Cubero J.L. 1996. Using RAPDs to study phylogenetic relationships in Rosa. *Theoretical and Applied Genetics* 92:273-277.
- Miller A.C.E., Brookers C.P., Loxdale H.D. y Cussans G.W. 1996. Using RAPD markers to identify genets of an arable grass weed *Arrhenatherum elatius* spp. bulbosum. *Annals of Applied Biology* 129:71-82.
- Mohan M., Nair S., Bentur J.S., Rao U.P. y Bennett J. 1994. RFLP and RAPD mapping of the rice *Gm2* gene that confers resistance to biotype 1 of gall midge (*Oroselia oryzae*). *Theoretical and Applied Genetics* 87:782-786.
- Moreno S., Gogorcena Y. y Ortiz J.M. 1995. The use of RAPD markers for identification of cultivated grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Scientia Horticulturae* 62:237-249.
- Mori M., Hosaka K., Umemoto Y. y Kaneda C. 1993. Rapid identification of Japanese potato cultivars by RAPDs. *Japanese Journal of Genetics* 68:167-174.
- Mosselet A., Egger K.N. y Hughes G.A. 1992. Low levels of genetic diversity in red pine confirmed by random amplified polymorphic DNA markers. *Canadian Journal of Forest Research* 22:1332-1337.
- Mouzevar S., Roedel-Dreyer P., Gombitzi I., Putimpon U., Toussieille De Labrousse D., Vear F. y Nicolas P. 1995. RFLP and RAPD mapping of the sorghum P. locus for resistance to *Phragmites litoralis* Race 1. *Theoretical and Applied Genetics* 91:733-737.

- Mudge J., Andersen W.R., Kehrer R.L. y Fairbanks D.J. 1996. A RAPD genetic map of *Saccharum officinarum*. *Crop Science* **36**:1362-1366.
- Mukai Y., Suyama Y., Tsumura Y., Kawahara T., Yoshimaru H., Kondo T., Tomaru N., Kuramoto N. y Murai M. 1995. A linkage map for sugi (*Cryptomeria japonica*) based on RFLP, RAPD, and isozyme loci. *Theoretical and Applied Genetics* **90**:835-840.
- Mukhopadhyay A., Arumugam N., Pradhan A.K., Murthy H.N., Yadav B.S., Sodhi Y.S. y Pental D. 1994. Somatic hybrids with substitution type genomic configuration TCBB for the transfer of nuclear and organelle genes from *Brassica tournefortii* TT to allotetraploid oilseed crop *B. carinata* BBCC. *Theoretical and Applied Genetics* **89**:19-25.
- Mulkahy D.L., Weeden N.F., Kessell R. y Carrolls B. 1992. DNA probes for the Y-chromosome of *Silene latifolia*, a dioecious angiosperm. *Sex Plant Reproduction* **5**:86-88.
- Multani D.S. y Lyon B.R. 1995. Genetic fingerprinting of Australian cotton cultivars with RAPD markers. *Genome* **38**:1005-1008.
- N'Goran J.A.K., Laurinet V., Risteerucci A.M. y Lanaud C. 1994. Comparative genetic diversity studies of *Theobroma cacao* L. using RFLP and RAPD markers. *Heredity* **73**:589-597.
- Nair S., Bentur J.S., Prasada Rao U. y Mohan M. 1995. DNA markers tightly linked to a gall midge resistance gene (*Gm2*) are potentially useful for marker-aided selection in rice breeding. *Theoretical and Applied Genetics* **91**:68-73.
- Nair S., Kumar A., Srivastata M.N. y Mohan M. 1996. PCR-based DNA markers linked to a gall midge resistance gene, *Gm4t*, has potential for marker-aided selection in rice. *Theoretical and Applied Genetics* **92**:660-665.
- Nelson C.D., Nance W.L. y Doudrick R.L. 1993. A partial genetic linkage map of slash pine (*Pinus elliottii* Engelm. var. *elliottii*) based on random amplified polymorphic DNAs. *Theoretical and Applied Genetics* **87**:145-151.
- Nesbitt K.A., Potts B.M., Vaillancourt R.E., West A.K. y Reid J.B. 1995. Partitioning and distribution of RAPD variation in a forest tree species, *Eucalyptus globulus* (Myrtaceae). *Heredity* **74**:628-637.
- Neuffer B. 1996. RAPD analyses in colonial and ancestral populations of *Capsella bursa-pastoris* (L.) Med. (Brassicaceae). *Biochemical Systematics and Ecology* **24**:393-403.
- Nienhuis J., Tiwang J., Kroch P. y dos-Santos J.B. 1995. Genetic relationships among cultivars and landraces of lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) as measured by RAPD markers. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **120**:300-306.
- Novy R.G. y Vorsa N. 1995. Identification of intracultivar genetic heterogeneity in cranberry using silver-stained RAPDs. *Hortiscience* **30**:600-604.
- Novy R.G. y Vorsa N. 1996. Evidence for RAPD heteroduplex formation in cranberry: implications for pedigree and genetic-relatedness studies and a source of co-dominant RAPD markers. *Theoretical and Applied Genetics* **92**:840-849.
- Novy R.G., Kobak C., Goffreda J. y Vorsa N. 1994. RAPDs identify varietal misclassification and regional divergence in cranberry (*Vaccinium macrocarpon* (Ait.) Pursh). *Theoretical and Applied Genetics* **88**:1004-1010.
- Novy R.G., Vorsa N. y Patten K. 1996. Identifying genotypic heterogeneity in 'McFarlin' cranberry: A randomly-amplified polymorphic DNA (RAPD) and phenotypic analysis. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **121**:210-215.
- Ohmori T., Murata M. y Motoyoshi F. 1995. Identification of RAPD markers linked to the *Tm-2* locus in tomato. *Theoretical and Applied Genetics* **90**:307-311.
- Ohmori T., Murata M. y Motoyoshi F. 1996. Molecular characterization of RAPD and SCAR markers linked to the *Tm-1* locus in tomato. *Theoretical and Applied Genetics* **92**:151-156.
- Ordon F., Schiemann A. y Friedt W. 1997. Assessment of the genetic relatedness of barley accessions (*Hordeum vulgare* s.l.) resistant to soil-borne mosaic-inducing viruses (BaMMV, BaYMV, BaYMV-2) using RAPDs. *Theoretical and Applied Genetics* **94**:325-330.
- Orozco-Castillo C., Chalmers K.J., Waugh R. y Powell W. 1994. Detection of genetic diversity and selective gene introgression in coffee using RAPD markers. *Theoretical and Applied Genetics* **87**:934-940.
- Ortiz A., Renaud R., Calzada Y. y Ritter E. 1997. Analysis of plum cultivars with RAPD markers. *Journal of Horticultural Science* **72**:1-9.
- Oxelman B. 1996. RAPD patterns, nrDNA ITS sequences and morphological patterns in *Silene* section *Sedoideae* (Caryophyllaceae). *Plant Systematics and Evolution* **201**:93-116.
- Oyama K. 1993. Conservation biology of tropical trees: demographic and genetic considerations. *Environment Update* **1**:17-32.
- Pammi S., Schertz K., Xu G., Hart G. y Mullet J.E. 1994. Random-amplified-polymorphic DNA markers in sorghum. *Theoretical and Applied Genetics* **89**:80-88.
- Paran I., Gidoni D. y Jacobsohn R. 1997. Variation between and within broomrape (*Orobanchae*) species revealed by RAPD markers. *Heredity* **78**:68-74.
- Parent J.G., Fortin M.C. y Pagé D. 1993. Identification de cultivars de framboisier par l'analyse d'ADN polymorphe amplifié au hasard (RAPD). *Canadian Journal of Plant Science* **73**:1115-1122.
- Parent J.G. y Pagé D. 1995. Authentification des 13 cultivars de fraiser du programme de certification du Québec par l'analyse d'ADN polymorphe amplifié au hasard (RAPD). *Canadian Journal of Plant Science* **75**:221-224.
- Peakall R., Smouse P.E. y Huff D.R. 1995. Evolutionary implications of allozyme and RAPD variation in diploid populations of dioecious buffalograss *Buchloe dactyloides*. *Molecular Ecology* **4**:135-147.
- Peltier D., Farcy E., Dulieu H. y Bervillé A. 1994. Origin, distribution and mapping of RAPD markers from wild

- Ptunia* species in *Ptunia* hybrids Hort lines. *Theoretical and Applied Genetics* 88:637-645.
- Penner G.A., Clarke J., Bezie L.J. y Leisle D. 1995. Identification of RAPD markers linked to a gene governing cadmium uptake in durum wheat. *Genome* 38:543-547.
- Perron M., Gordon A.G. y Bousquet J. 1995. Species-specific RAPD fingerprints for the closely related *Picea mariana* and *P. rubens*. *Theoretical and Applied Genetics* 91:142-149.
- Philbrick C.T. 1993. Underwater cross-pollination in *Callitriche hermaphrodita* (Callitricheaceae): evidence from random amplified polymorphic DNA markers. *American Journal of Botany* 80:391-394.
- Phippen W.B., Kresovich S., Candelas E.G. y McFerson J.R. 1997. Molecular characterization can quantify and partition variation among gene bank holdings: a case study with phenotypically similar accessions of *Brassica oleracea* var. *capitata* L. (cabbage) 'Golden Acre'. *Theoretical and Applied Genetics* 94:227-234.
- Pillay M. y Kenny S.T. 1996. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers in hop, *Humulus lupulus*: level of genetic variability and segregation in F_1 progeny. *Theoretical and Applied Genetics* 92:334-339.
- Plomion C., Bahrman N., Durel C.E. y O'Malley D.M. 1995a. Genomic mapping in *Pinus pinaster* (maritime pine) using RAPD and protein markers. *Heredity* 74:661-668.
- Plomion C., O'Malley D.M. y Durel C.E. 1995b. Genomic analysis in maritime pine (*Pinus pinaster*). Comparison of two RAPD maps using selfed and open-pollinated seeds of the same individual. *Theoretical and Applied Genetics* 90:1028-1034.
- Plomion C., Durel C.E. y O'Malley D.M. 1996a. Genetic dissection of height in maritime pine seedlings raised under accelerated growth conditions. *Theoretical and Applied Genetics* 93:849-856.
- Plomion C., Yari A. y Marpeau A. 1996b. Genetic determinism of delta-3-carene in maritime pine using RAPD markers. *Genome* 39:1123-1127.
- Pooler M.R. y Scorza R. 1995. Errant transmission of RAPD markers in haploids, doubled haploids, and F_1 hybrids of peach: Observations and speculation on causes. *Scientia Horticulturae* 64:233-241.
- Prociuniec J.D., Towlev-Smith T.E., Fox S., Prashar S., Gray M., Kim W.K., Czarniecki E. y Dyck P.L. 1995. PCR-based RAPD-DGGE markers linked to leaf rust resistance genes *Lr29* and *Lr25* in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Journal of Genetics and Breeding* 49:87-91.
- Qu L. y Hancock J.F. 1995. Nature of 2n gamete formation and mode of inheritance in interspecific hybrids of diploid *Vaccinium darwini* and tetraploid *V. corymbosum*. *Theoretical and Applied Genetics* 91:1309-1315.
- Qu L. y Hancock J.F. 1997. Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) based genetic linkage map of blueberry derived from an interspecific cross between diploid *Vaccinium darwini* and tetraploid *V. corymbosum*. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 122:69-73.
- Qu X., Lu J. y Lamikanra O. 1996. Genetic diversity in muscadine and American bunch grapes based on random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. *Journal of American Society for Horticultural Science* 121:1020-1023.
- Quiros C.F., Ceada A., Georgescu A. y Hu J. 1993. Use of RAPD markers in potato genetics segregations in diploid and tetraploid families. *American Potato Journal* 70:35-42.
- Rafalski J.A., Tingey S.V. y Williams J.G.K. 1991. RAPD markers—a new technology for genetic mapping and plant breeding. *Agricultural Biotechnology News and Information* 3:645-648.
- Rajapakse S., Belthoff L.E., He G., Estager A.E., Scorza R., Verde Y., Ballard R.E., Baird W.V., Callahan A., Monet R. y Abbott A.G. 1995. Genetic linkage mapping in peach using morphological, RFLP and RAPD markers. *Theoretical and Applied Genetics* 90:503-510.
- Ranker T.A. 1994. Evolution of high genetic variability in the rare Hawaiian fern *Adenophorus perkinsi* and implications for conservation management. *Biological Conservation* 70:19-24.
- Ratnaparkhe M.B., Gupta V.S., Ven Murthy M.R. y Ranjekar P.K. 1995. Genetic fingerprinting of pigeonpea [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.] and its wild relatives using RAPD markers. *Theoretical and Applied Genetics* 91:893-898.
- Regner F. y Messner R. 1993. Molecular differentiation of vine cultivars by means of RAPD-analysis. *Mitteilungen Klosterneuburg* 43:160-164.
- Reiter R.S., Williams J.G.K., Feidmann K.A., Rafalski J.A., Tingey S.V. y Scolnik P.A. 1992. Global and local genome mapping in *Arabidopsis thaliana* by using recombinant inbred lines and random amplified polymorphic DNAs. *Proceedings of the National Academy of Science, USA* 89:1477-1481.
- Renou J.-P., Aubry C., Serveau M. y Jalouzi P. 1997. Evaluation of the genetic variability in the genus *Pelargonium* using RAPD markers. *Journal of Horticultural Science* 72:229-237.
- Rieseberg L.H. 1996. Homology among RAPD fragments in interspecific comparisons. *Molecular Ecology* 5:99-105.
- Rieseberg L.H., Choi H., Chan R. y Spore C. 1993. Genomic map of a diploid hybrid species. *Heredity* 70:285-293.
- Rieseberg L.H. y Gerber D. 1995. Hybridization in the Catalina Island Mountain Mahogany (*Cercocarpus traskiae*): RAPD evidence. *Conservation Biology* 9:199-203.
- Rieseberg L.H., Arias D.M., Ungerer M.C., Linder C.R. y Sierro B. 1996. The effects of mating design on introgression between chromosomally divergent sunflower species. *Theoretical and Applied Genetics* 93:633-644.
- Rieseberg L.H., van Fossen C. y Desrochers M. 1995. Hybrid speciation accompanied by genomic reorganization in wild sunflowers. *Nature* 375:313-316.
- Robbins M.A., Witsenboer H., Michelmore R.W., Lalberté J.-F. y Fortin M.G. 1994. Genetic mapping of turnip

- mosaic virus resistance in *Lactuca sativa*. *Theoretical and Applied Genetics* 89:583-589.
- Roche P., Alston F.H., Maliepaard C., Evans K.M., Vrieland R., Dunemann F., Markussen T., Tartarini S., Brown L.M., Ryder C. y King G.J. 1997. RFLP and RAPD markers linked to the rosy leaf curling aphid resistance gene (*Sd-1*) in apple. *Theoretical and Applied Genetics* 94:528-533.
- Roelefs D. y Bachmann K. 1995. Chloroplast and nuclear DNA variation among homozygous plants in a population of the autogamous annual *Micrurus douglasii* (Asteraceae, Lactuceae). *Plant Systematics and Evolution* 196:185-194.
- Rokka V.-M., Xu Y.-S., Kankila J., Kuusela A., Pulli S. y Pehu E. 1994. Identification of somatic hybrids of dihaploid *Solanum tuberosum* lines and *S. brevidens* by species RAPD patterns and assessment of disease resistance of the hybrids. *Euphytica* 80:207-217.
- Ronning C.M., Schnell R.J. y Gazit S. 1995a. Using randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) markers to identify *Annona* cultivars. *Journal of American Society for Horticultural Science* 120:726-729.
- Ronning C.M., Schnell R.J. y Kuhn D.N. 1995b. Inheritance of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers in *Theobroma cacao* L. *Journal of American Society for Horticultural Science* 120:681-686.
- Rossetto M., Weaver P.K. y Dixon K.W. 1995. Use of RAPD analysis in devising conservation strategies for the rare and endangered *Grevillea scapigera* (Proteaceae). *Molecular Ecology* 4:321-329.
- Rowland L.J. y Levi A. 1994. RAPD-based genetic linkage map of blueberry derived from a cross between diploid species (*Vaccinium darwinii* and *V. ellipticum*). *Theoretical and Applied Genetics* 87:863-868.
- Roy A., Frascaria N., Mackay J. y Bousquet J. 1992. Segregating random amplified polymorphic DNAs RAPDs in *Betula alleghaniensis*. *Theoretical and Applied Genetics* 85:173-180.
- Russell J.R., Hosein F., Johnson E., Waugh R. y Powell W. 1993. Genetic differentiation of cocoa (*Theobroma cacao* L.) populations revealed by RAPD analysis. *Molecular Ecology* 2:89-97.
- Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel S., Scharf S.J., Higuchi R., Horn G.T., Mullis K.B. y Erlich H.A. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239:487-491.
- Sale M.M., Potts B.M., West A.K., Reid J.B. 1996. Molecular differentiation within and between *Eucalyptus rosdonii*, *E. amigdalyna* and their hybrids using RAPD markers. *Australian Journal Botany* 44:559-569.
- Salentijn M.J., Arens-De Reuver M.J.B., Lange W., De Bock Th.S.M., Stiekema W.J. y Klein-Lankhorst M. 1995. Isolation and characterization of RAPD-based markers linked to the beet cyst nematode resistance locus (*Hs1pat-1*) on chromosome 1 of *B. patellaris*. *Theoretical and Applied Genetics* 90:885-891.
- Samec P. y Nasinec V. 1995. Detection of DNA polymorphism among pea cultivars using RAPD technique. *Biologia Plantarum* 37:321-327.
- Samec P. y Nasinec V. 1996. The use of RAPD technique for the identification and classification of *Pisum sativum* L. genotypes. *Euphytica* 89:229-234.
- Satovic Z., Torres A.M. y Cubero J.I. 1996. Genetic mapping of new morphological, isozyme and RAPD markers in *Vicia faba* L. using trisomics. *Theoretical and Applied Genetics* 93:1130-1138.
- Schachermayr G., Siedler H., Gale M.D., Windzeler H., Windzeler M. y Keller B. 1994. Identification and localization of molecular markers linked to the *Lr9* leaf rust resistance gene of wheat. *Theoretical and Applied Genetics* 88:110-115.
- Schachermayr G.M., Messmer M.M., Feuillet C., Winzeler H., Winzeler M. y Keller B. 1995. Identification of molecular marker linked to the *Agropyron-nigritum*-derived leaf rust resistance gene *Lr24* in wheat. *Theoretical and Applied Genetics* 90:982-990.
- Scheepers D., Eloy M.-C. y Briquet M. 1997. Use of RAPD patterns for clone verification and in studying provenance relationships in Norway spruce (*Picea abies*). *Theoretical and Applied Genetics* 94:480-485.
- Schnell R.J. y Ronning C.M. 1995. Identification of cultivars and validation of genetic relationships in *Mangifera indica* L. using RAPD markers. *Theoretical and Applied Genetics* 90:269-274.
- Scholten O.E., Klein Lankhorst R.M., Esselink D.C., De Bock T.S.M. y Lange W. 1997. Identification and mapping of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers linked to resistance against beet necrotic yellow vein virus (BNYVV) in Beta accessions. *Theoretical and Applied Genetics* 94:123-130.
- Schulz B., Westphal L. y Wricke G. 1994. Linkage groups of isozymes, RFLP and RAPD markers in carrot (*Daucus carota* L. sativus). *Euphytica* 74:67-76.
- Shah F.H., Rashid O., Simons A.J. y Dunsdon A. 1994. The utility of RAPD markers for the determination of genetic variation in oil palm (*Elaeis guineensis*). *Theoretical and Applied Genetics* 89:713-718.
- Sharma S.K., Dawson I.K. y Wagh R. 1995. Relationships among cultivated and wild lentils revealed by RAPD analysis. *Theoretical and Applied Genetics* 91:647-654.
- Sharma S.K., Knox M.R. y Ellis T.H.N. 1996. AFLP analysis of the diversity and phylogeny of *Lens* and its comparison with RAPD analysis. *Theoretical and Applied Genetics* 93:751-758.
- Shatters R.G.Jr., Schweder M.E., West S.H., Abdelghany A. y Smith R.L. 1995. Environmentally induced polymorphisms detected by RAPD analysis of soybean seed DNA. *Seed Science Research* 5:109-116.
- Shen Y., Newbury H.J. y Ford-Lloyd B.V. 1996. The taxonomic characterization of annual Beta germplasm in a

- genetic resources collection using RAPD markers. *Euphytica* **91**:205-212.
- Sigurdson V., Ananthawat-Jonsson K. y Sigurgeirsson A. 1995a. DNA fingerprinting of *Populus trichocarpa* clones using RAPD markers. *New Forest* **10**:197-206.
- Sigurdson V., Sigurgeirsson A. y Ananthawat-Jonsson K. 1995b. Identification of clones of the indigenous Icelandic *Populus tremula* and introduced *P. trichocarpa* by RAPD techniques. *Buvisindi* **9**:145-152.
- Skroch P. y Nienhuis J. 1995a. Impact of scoring error and reproducibility of RAPD data on RAPD based estimates of genetic distance. *Theoretical and Applied Genetics* **91**:1086-1091.
- Skroch P. y Nienhuis J. 1995b. Qualitative and quantitative characterization of RAPD variation among snap bean (*Phaseolus vulgaris*) genotypes. *Theoretical and Applied Genetics* **91**:1078-1085.
- Smith J.F. y Pham T.V. 1996. Genetic diversity of the narrow endemic *Allium aaseae* (Alliaceae). *American Journal of Botany* **83**:717-726.
- Smith J.F., Burke C.C. y Wagner W.L. 1996. Interspecific hybridization in natural populations of *Cyrtandra* (Gesneriaceae) on the Hawaiian Islands: Evidence from RAPD markers. *Plant Systematics and Evolution* **200**:61-77.
- Sondur S.N., Manshardt R.M. y Stiles J.L. 1996. A genetic linkage map of papaya based on randomly amplified polymorphic DNA markers. *Theoretical and Applied Genetics* **93**:547-553.
- Stammers M., Harris J., Evans G.M., Hayward M.D. y Forster J.W. 1995. Use of random PCR (RAPD) technology to analyse phylogenetic relationships in the *Lotus-Festuca* complex. *Heredity* **74**:19-27.
- Stevens M.R., Lamb E.M. y Rhoads D.D. 1995. Mapping the *Sm-5* locus for tomato spotted wilt virus resistance in tomatoes using RAPD and RFLP analyses. *Theoretical and Applied Genetics* **90**:451-456.
- Stewart C.N.Jr. y Excoffier L. 1996. Assessing population genetic structure and variability with RAPD data: Application to *Vaccinium macrocarpon* (American cranberry). *Journal of Evolutionary Biology* **9**:153-171.
- Stewart C.N.Jr. y Porter D.M. 1995. RAPD profiling in biological conservation: An application to estimating clonal variation in rare endangered *Iliamna* in Virginia. *Biological Conservation* **74**:135-142.
- Stockinger E.J., Mulinix G.A., Long C.M., Brettin T.S. y Lezzoni A.F. 1996. A linkage map of sweet cherry based on RAPD analysis of a microspore-derived callus culture population. *Journal of Heredity* **87**:214-218.
- Sugawara K., Oowada A., Moriguchi T. y Omura M. 1995. Identification of *Citrus chimeras* by RAPD markers. *Horticulture* **30**:1276-1278.
- Suh H.S., Sato Y.I. y Morishima H. 1997. Genetic characterization of weedy rice (*Oryza sativa* L.) based on morpho-physiology, isozymes and RAPD markers. *Theoretical and Applied Genetics* **94**:316-321.
- Sweeney P.M. y Danneberger T.K. 1995. RAPD characterization of *Poa annua* L. populations in golf course greens and fairways. *Crop Science* **35**:1676-1680.
- Szmidt A.E., Wang X.-R. y Lu, M.-Z. 1996. Empirical assessment of allozyme and RAPD variation in *Pinus sylvestris* (L.) using haploid tissue analysis. *Heredity* **76**:412-420.
- Talbert L.E., Blake N.K., Chee P.W., Blake T.K. y Magyar G.M. 1994. Evaluation of "sequence-tagged-site" PCR products as molecular markers in wheat. *Theoretical and Applied Genetics* **87**:789-794.
- Tancred S.J., Zeppa A.G. y Graham G.C. 1994. The use of the PCR-RAPD technique in improving the plant variety rights description of a new Queensland apple (*Malus domestica*) cultivar. *Australian Journal of Experimental Agriculture* **34**:665-667.
- Tanhuanpää P.K., Vilkki J.P. y Vilkki H.J. 1995a. Identification of a RAPD marker for palmitic-acid concentration in the seed oil of spring turnip rape (*Brassica rapa* ssp. *oleifera*). *Theoretical and Applied Genetics* **91**:477-480.
- Tanhuanpää P.K., Vilkki J.P. y Vilkki H.J. 1995b. Association of a RAPD marker with linolenic acid concentration in the seed oil of rapeseed (*Brassica napus* L.). *Genome* **38**:414-416.
- Tanhuanpää P.K., Vilkki J.P. y Vilkki H.J. 1996. Mapping of a QTL for oleic acid concentration in spring turnip rape (*Brassica rapa* ssp. *oleifera*). *Theoretical and Applied Genetics* **92**:952-956.
- Tartarini S. 1996. RAPD markers linked to the *Vf* gene for scab resistance in apple. *Theoretical and Applied Genetics* **92**:803-810.
- Tatineni V., Cantrell R.G. y Davis D.D. 1996. Genetic diversity in elite cotton germoplasm determined by morphological characteristics and RAPDs. *Crop Science* **36**:186-192.
- Taylor P.W.J., Geijskes J.R., Ko H.-L., Fraser T.A., Henry R.J. y Birch R.G. 1995. Sensitivity of random amplified polymorphic DNA analysis to detect genetic change in sugarcane during tissue culture. *Theoretical and Applied Genetics* **90**:1169-1173.
- Thompson P.G., Hong L.L., Ukoskit K. y Zhu Z. 1997. Genetic linkage of randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) markers in sweetpotato. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **122**:79-82.
- Thormann C.E., Ferreira M.E., Camargo L.E.A., Tivang J.G. y Osborn T.C. 1994. Comparison of RFLP and RAPD markers to estimating genetic relationships within and among cruciferous species. *Theoretical and Applied Genetics* **88**:973-980.
- Timmerman G.M., Frew T.J., Weeden N.F., Miller A.L. y Goulden D.S. 1994. Linkage analysis of *er-1*, a recessive *Pisum sativum* gene for resistance to powdery mildew fungus (*Erysiphe pisi* D.C.). *Theoretical and Applied Genetics* **88**:1050-1055.
- Timmerman-Vaughan G.M., McCallum J.A., Frew T.J., Weeden N.F. y Russell A.C. 1996. Linkage mapping of

- quantitative trait loci controlling seed weight in pea (*Pisum sativum* L.). *Theoretical and Applied Genetics* **93**:431-439.
- Tivang J., Skroch P.W., Nienhuis J. y de Vos N. 1996. Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) variation among and within artichoke (*Cynara scolymus* L.) cultivars and breeding populations. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **121**:783-788.
- Trame A.M., Coddington A.J. y Paige K.N. 1995. Field and genetic studies testing optimal outcrossing in *Agave schottii*, a long-lived clonal plant. *Oecologia* **104**:93-100.
- Transue D.K., Fairbanks D.J., Robison L.R. y Andersen W.R. 1994. Species identification of RAPD analysis of grain amaranth genetic resources. *Crop Science* **34**:1385-1389.
- Truco M.J. y Quiros C.F. 1994. Structure and organization of the B genome based on a linkage map in *Brassica nigra*. *Theoretical and Applied Genetics* **89**:590-598.
- Tuskan G.A., Francis K.E., Russ S.L., Romme W.H. y Turner M.G. 1996. RAPD markers reveal diversity within and among clonal and seedling stands of aspen in Yellowstone National Park, U.S.A. *Canadian Journal of Forest Research* **26**:2088-2098.
- Uphoff H. y Wicke G. 1992. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers in sugar beet (*Beta vulgaris* L.): mapping the genes for nematode resistance and hypocotyl colour. *Plant Breeding* **109**:164-171.
- Urrea C.A., Miklas P.N., Beaver J.S. y Riley R.H. 1996. A codominant randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) marker useful for indirect selection of bean golden mosaic virus resistance in common bean. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **121**:1035-1039.
- van Heusden A.W. y Bachmann K. 1992a. Genetic differentiation of *Microseris pygmaea* (Asteraceae, Lactucaceae) studied with DNA amplification from arbitrary primers RAPDs. *Acta Botanica Neerlandica* **41**:385-395.
- van Heusden A.W. y Bachmann K. 1992b. Genotype relationships in *Microseris elegans* (Asteraceae, Lactucaceae) revealed by DNA amplification from arbitrary primers (RAPDs). *Plant Systematics and Evolution* **179**:221-233.
- van Houten W., van Raamsdonk L. y Bachmann K. 1994. Intraspecific evolution of *Microseris pygmaea* (Asteraceae, Lactuceae) analyzed by cosegregation of phenotypic characters (QTLs) and molecular markers (RAPDs). *Plant Systematics and Evolution* **190**:49-67.
- van Raamsdonk L.W.D., Smiech M.P. y Sandbrink M. 1997. Introgression explains incongruence between nuclear and chloroplast DNA-based phylogenies in *Allium* section *Cepa*. *Theoretical and Applied Genetics* **123**:91-108.
- Vellekoop P., Buntjer J.B., Maas J.W. y van Brederode J. 1996. Can the spread of agriculture in Europe be followed by tracing the spread of the weed *Silene latifolia*. A RAPD study. *Theoretical and Applied Genetics* **92**:1085-1090.
- Verhaegen D. y Plomion C. 1996. Genetic mapping in *Eucalyptus wrophylla* and *Eucalyptus grandis* using RAPD markers. *Genome* **39**:1051-1061.
- Vicario F., Vendramin G.G., Rossi P., Liu P. y Giannini R. 1995. Allozyme, chloroplast DNA and RAPD markers for determining genetic relationships between *Abies alba* and the relict population of *Abies nebrodensis*. *Theoretical and Applied Genetics* **90**:1012-1018.
- Vierling R.A. y Nguyen H.T. 1992. Use of RAPD markers to determine the genetic diversity of diploid wheat genotypes. *Theoretical and Applied Genetics* **84**:835-838.
- Vierling R.A., Xiang Z., Joshi C.P., Gilbert M.L. y Nguyen H.T. 1994. Genetic diversity among elite *Sorghum* lines revealed by restriction fragment length polymorphisms and random amplified polymorphic DNAs. *Theoretical and Applied Genetics* **87**:816-820.
- Virk P.S., Newbury H.J., Jackson M.T. y Ford-Lloyd B.V. 1995. The identification of duplicate accessions within a rice germoplasm collection using RAPD analysis. *Theoretical and Applied Genetics* **90**:1049-1055.
- Wang B., Xu W.W., Wang J.Z., Wu W., Zheng H.G., Yang Z.Y., Rav J.D. y Nguyen H.T. 1995. Tagging and mapping the thermo-sensitive gene male-sterile gene in rice (*Oryza sativa* L.) with molecular markers. *Theoretical and Applied Genetics* **91**:1111-1114.
- Wang W.Y., Pai R.C., Lai C.C. y Lin T.P. 1994. Molecular evidence for the hybrid origin of *Paikonia taiwaniana* based on RAPD markers and RFLP of chloroplast DNA. *Theoretical and Applied Genetics* **89**:271-275.
- Wang Z-S., Chen H., Zhu L-H. y Wang X-K. 1996. RAPD determinations on the genetic differentiation of Chinese common wild rice *Acta Botanica Sinica* **38**:749-752.
- Warburton M.L. y Bliss F.A. 1996. Genetic diversity in peach (*Prunus persica* L. Batsch) revealed by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) markers and compared to inbreeding coefficients. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **121**:1012-1019.
- Warburton M.L., Becerra-Velasquez V.L., Goffreda J.C. y Bliss F.A. 1996. Utility of RAPD markers in identifying genetic linkages to genes of economic interest in peach. *Theoretical and Applied Genetics* **93**:920-925.
- Waugh R. y Powell W. 1992. Using RAPD markers for crop improvement. *Trends in Biotechnology* **10**:186-191.
- Waugh R., Baird E. y Powell W. 1992. The use of RAPD markers for the detection of gene introgression in potato. *Plant Cell Reports* **11**:466-469.
- Weeden N.F., Muehlbauer F.J. y Ladizinsky G. 1992. Extensive conservation of linkage relationships between pea and lentil genetic maps. *Journal of Heredity* **83**:123-129.
- Wei J.-Z. y Wang R.R.-C. 1995. Genome and species-specific markers and genome relationships of diploid perennial species in Triticeae based on RAPD analyses. *Genome* **38**:1230-1236.
- Weir B.S. y Cockerham C.C. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* **38**:1358-1370.
- Welsh J., Honeycutt R.J., McClelland M. y Sobral B.W.S. 1991. Parentage determination in maize hybrids using the

CAPÍTULO 2.

POLINIZACIÓN Y FENOLOGÍA REPRODUCTIVA DE
Chamaedorea alternans H.A. WENDL. EN LA SELVA
DE LOS TUXTLAS, VERACRUZ

Resumen

Se documentan el mecanismo de polinización y la fenología reproductiva de la palma dioica *Chamaedorea alternans* en la selva de Los Tuxtlas, Veracruz durante el evento reproductivo de 1995-1996.

Los resultados de las observaciones sobre los insectos visitantes y de los experimentos de polinización dan evidencia de anemofilia en *Ch. alternans*. No se encontraron diferencias significativas en la producción de frutos entre inflorescencias excluidas y no excluidas de insectos.

El periodo de floración de la población fue del 15 de octubre de 1995 al 17 de enero de 1996, presentándose una gran variación entre los individuos en la duración de la floración (2 a 39 días) y en el número de inflorescencias producidas (1 a 12 pistiladas y 1 a 23 estaminadas). El número de individuos reproductivos, de inflorescencias y flores por inflorescencia fue mayor en los machos que en las hembras. Sólo cinco individuos femeninos y ocho masculinos (de un total de 25 y 37 respectivamente) contribuyeron con el 45% de las inflorescencias producidas por la población a lo largo del periodo de estudio, estos cinco individuos femeninos contribuyeron también con cerca del 75% de la producción de frutos, lo cual implica que una fracción muy pequeña de la población contribuye de manera importante a la cohorte de semillas del año de estudio.

Se observó un incremento significativo en la producción de inflorescencias e infrutescencias con la altura de la palma. El rendimiento de frutos medido como la relación entre el número de frutos en función de las flores producidas no se relacionó directamente con la altura, debido a que el 27% de las inflorescencias no produjeron frutos. Este rendimiento se incremento significativamente con la producción de flores e inflorescencias. Dos evidencias sugieren que el rendimiento de frutos puede estar limitado por la disponibilidad del polen: i) el rendimiento de frutos se incrementa significativamente conforme aumenta el número de flores estaminadas en un radio de distancia de entre 5 y 7 m y ii) existió un mayor rendimiento de frutos en las inflorescencias producidas durante el pico de floración poblacional, cuando la cantidad de polen producido fue mayor.

Se concluye que *Ch. alternans* es polinizada por viento y que su floración es anual, con un patrón regular que va de mediados de octubre a mediados de enero. Existe gran variación entre los individuos en la duración del periodo de floración y en la producción de estructuras reproductivas. Se sugiere que el rendimiento de frutos puede estar influenciado por la disponibilidad espacial y temporal de polen, más que por una limitación de recursos.

Introducción

Dos eventos interrelacionados de la biología reproductiva de las plantas son la fenología floral y la polinización. La fenología se refiere a la manera en cómo se manifiestan morfológicamente los organismos a lo largo del tiempo, en el cual ocurren fenómenos o procesos recurrentes dentro de su ciclo de vida (Rathcke y Lacey, 1985). La variación en la fenología floral afecta el flujo génico dentro y entre poblaciones (McNeilly y Antonovics, 1968; Fripp *et al.*, 1986) y varios aspectos relacionados con las semillas; particularmente la producción de semillas (Augspurger, 1980; Schmitt, 1983; Zimmerman, 1984; Galen y Stanton, 1991), el tamaño (Roach, 1986; Wulff, 1986), la dispersión (Lacey y Pace, 1983) y el riesgo de depredación (Augspurger, 1981, Collinge y Louda, 1989). Por otra parte, los factores abióticos pueden limitar el periodo de floración al afectar la capacidad de producir flores o la actividad de los vectores de polen (Rathcke y Lacey, 1985; van Schaik *et al.*, 1993).

Existe un importante número de trabajos de fenología floral que se han llevado a cabo principalmente a nivel de la comunidad y han mostrado que este fenómeno es muy variable, aunque responde generalmente a la estacionalidad climática de las selvas tropicales. En particular para las selvas cálidas húmedas el pico de floración ocurre durante la época de secas, no obstante, todo el año se presentan especies en floración (Frankie *et al.*, 1974; Opler *et al.*, 1980; Lieberman, 1982; Baker *et al.*, 1983; Carabias-Lillo y Guevara, 1985; Gentry y Emmons, 1987; Putz y Windsor, 1987; Heideman, 1989; Corlett, 1990; Ibarra-Manríquez *et al.*, 1991; Opler *et al.*, 1991; Ibarra-Manríquez, 1992). En términos generales, se ha sugerido que existen dos patrones principales de floración: I) la floración en masa y de corta duración, que es común entre árboles que florecen durante la época de secas y II) una floración prolongada, en donde los individuos producen pocas flores por día, durante largos periodos de tiempo y la cual se ha observado en algunas especies del sotobosque (Gentry, 1974; Augspurger, 1980).

La diferente estacionalidad reproductiva de las especies de selva no se restringe a nivel comunitario sino que puede observarse incluso dentro de unidades taxonómicas, particularmente a nivel de familia (Gentry, 1974; Bullock, 1981; de Steven *et al.*, 1987; Ibarra-Manríquez, 1992). Sin embargo, existe escasa información acerca de los patrones fenológicos intrapoblacionales de las especies de las selvas cálidas húmedas (*p.ej.* Augspurger, 1980, 1981; Henderson, 1984; Ippolito y Armstrong, 1993; Bernal y Ervik, 1996), y se conoce aún menos acerca de la importancia de la variación fenológica sobre la producción de frutos y semillas.

Por lo general, en las especies vegetales sólo una proporción de sus flores producidas se desarrollan hasta frutos maduros (Winsor *et al.*, 1987). El rendimiento de frutos es una medida relativa del éxito reproductivo femenino y se determina cuantificando el número de frutos maduros entre el número de flores femeninas (Sutherland, 1986). Se ha sugerido que el rendimiento de frutos puede estar limitado por la disponibilidad de polen (especialmente en plantas con entrecruzamiento obligado) y/o por recursos o capacidad fisiológica (Platt *et al.*, 1974; Silander, 1978; Allison, 1990; Honig *et al.*, 1992; Kunin, 1992; 1993; Mack, 1997).

Los escasos estudios del efecto de la distancia a la fuente de polen sobre la producción de semillas en especies dioicas de selva han encontrado que, conforme aumenta la distancia entre individuos masculinos y femeninos, la posibilidad de apareamiento es menor (House, 1992; Mack, 1997). Por otro lado, se ha propuesto que entre más grande es una planta, mayor es su capacidad para adquirir recursos y a su vez de producir semillas (Schmitt, 1983; Venable, 1992).

Sutherland (1986a, b) examinó los patrones de rendimiento de frutos para 447 especies y encontró que éste es menor en las plantas auto-incompatibles (0.33) que en las auto-compatibles (0.69) y que estas diferencias varían con el sistema de apareamiento. El rendimiento de frutos evaluado para algunas especies tropicales se presenta en el cuadro 1, con el valor mínimo detectado en *Bernoullia flammea* (0.00001) y el máximo en *Ochroma lagopus* (0.92).

Cuadro 1 Rendimiento de frutos evaluado para diferentes especies vegetales, incluyendo la familia a la que pertenece y su forma de crecimiento (FC): hierba, H; arbusto, AR; árbol, A y palma, P.

Especie	Familia	FC	frutos/flores	Cita
<i>Bernoullia flammea</i>	Bombacaceae	A	0.00001-0.00023	7*
<i>Enterolobium cyclocarpum</i>	Leguminosae	A	0.001	3
<i>Spondias mombin</i>	Anacardiaceae	A	0.01	3
<i>Tabebuia rosea</i>	Bignoniaceae	A	0.01	3
<i>Hirtella racemosa</i>	Chrysobalanaceae	A	0.01	3
<i>Caesalpinia eriostachys</i>	Leguminosae	A	0.01	3
<i>Lonchocarpus costaricensis</i>	Leguminosae	A	0.01	3
<i>Guazuma tomentosa</i>	Ulmaceae	A	0.01	3
<i>Tabebuia neochrysantha</i>	Bignoniaceae	A	0.02	3
<i>Hymenaea courbaril</i>	Leguminosae	A	0.02	3
<i>Tabebuia palmeri</i>	Bignoniaceae	A	0.04	3
<i>Pterocarpus rohrii</i>	Leguminosae	A	0.07	3
<i>Cornus sanguinea</i>	Comaceae	AR	0.078-0.216	8
<i>Pithecelobium saman</i>	Leguminosae	A	0.09	3
<i>Cochlospermum vitifolium</i>	Cochlospermaceae	A	0.11	3
<i>Chamaedorea alternans</i>	Arecaceae	P	0.12	16
<i>Cordia alliodora</i>	Boraginaceae	A	0.15	12
<i>Malpigia glabra</i>	Malpighiaceae	AR	0.15	3
<i>Cordia elaeagnoides</i>	Boraginaceae	A	0.15-0.2	13*
<i>Acrocomia aculeata</i>	Arecaceae	P	0.13-0.16	14
<i>Calyptrogyne ghesbreghtiana</i>	Arecaceae	P	0.17-0.22	17
<i>Bauhinia unguolata</i>	Leguminosae	A	0.20	10*
<i>Cordia collococa</i>	Boraginaceae	A	0.21	12
<i>Cordia panamensis</i>	Boraginaceae	A	0.21	12
<i>Cordia dentata</i>	Boraginaceae	A	0.23	12
<i>Bauhinia unguolata</i>	Leguminosae	A	0.23	3
<i>Byrsonima crassifolia</i>	Malpighiaceae	A	0.25	3
<i>Nectandra ambigens</i>	Lauraceae	A	0.25-0.35	4*
<i>Cordia inermis</i>	Boraginaceae	A	0.27	12
<i>Bauhinia pauletia</i>	Leguminosae	A	0.28	9*
<i>Ranunculus adoneus</i>	Ranunculaceae	H	0.306	6
<i>Cordia pronglii</i>	Boraginaceae	A	0.32	12
<i>Siparuna spp.</i>	Monimiaceae	A	0.36-0.87	5
<i>Curatella americana</i>	Dilleniaceae	A	0.42	3
<i>Hornstedtia scottiana</i>	Zingiberaceae	H	0.427	11
<i>Byrsonima crassifolia</i>	Malpighiaceae	A	0.47 - 0.56	2*
<i>Curatella americana</i>	Dilleniaceae	A	0.56-0.74	2*
<i>Astrocaryum mexicanum</i>	Arecaceae	P	0.60	13*
<i>Ardisia revoluta</i>	Myrsinaceae	A	0.66	3
<i>Ochroma pyramidale (lagopus)</i>	A	A	0.75-0.92	7*
<i>Mabea fistulifera</i>	Euphorbiaceae	A	0.782	15
<i>Orbignya phalerata</i>	Arecaceae	P	0.784	1
<i>Ochroma pyramidale</i>	A	A	0.97	3

citas: ¹Anderson y Overal, 1988; ²Ataroff, 1975*; ³Bawa, 1974; ⁴Córdova, 1985; ⁵Feil, 1992; ⁶Galen y Stanton, 1991; ⁷García Gutiérrez, 1976*; ⁸Gutián *et al.*, 1996; ⁹Heithaus, *et al.*, 1974*; ¹⁰Heithaus, *et al.*, 1982*; ¹¹Ippolito y Armstrong, 1993; ¹²Opler, Baker y Frankie, 1975; ¹³Saukhán, 1980*; ¹⁴Scariot y Lleras, 1995; ¹⁵Vieira y Carvalho-Okano, 1996; ¹⁶Oyama, 1987; ¹⁷Cunningham, 1996.

* Rendimiento de frutos citado en Córdova, 1985

En particular para *Chamaedorea alternans* se ha reportado un rendimiento de frutos de aproximadamente 12% (Oyama, 1987). Este rendimiento de frutos es menor que el promedio para especies auto-incompatibles (Sutherland, 1986a) y menor con relación a el de otras especies tropicales (Cuadro 1), lo que probablemente se debe a ciertas restricciones morfológicas entre el tamaño de las raquillas de la inflorescencia y el tamaño de los frutos (Oyama, 1997).

Las palmas del género *Chamaedorea* presentan características asociadas con la anemofilia, como son flores pequeñas, numerosas, unisexuales, con perianto pequeño o ausente y de colores amarillo verdosos, con las anteras y estigmas expuestos y los estambres con granos de polen pequeños y abundantes. Con base en estas características, Bawa y Crisp (1980) han sugerido la posibilidad de que las palmas de este género puedan ser polinizadas por viento. Hodel (1992) considera que la anemofilia es poco probable y que muchas de estas características florales son posibles adaptaciones que confieren un medio para evitar la depredación por insectos. Una posición intermedia es adoptada por Oyama (1997), quien sugiere que algunas especies son polinizadas por viento, mientras que otras como *Ch. elatior* requieren probablemente de un insecto o de algún otro vector para el transporte de polen, básicamente porque presentan polen pegajoso.

El presente trabajo sobre la biología reproductiva en *Ch. alternans* es un primer avance en la generación de información básica para determinar los patrones de apareamiento dentro de la población mediante un análisis de

paternidad. Primeramente, se determinó el mecanismo de polinización en *Ch. alternans* mediante observaciones y experimentos en el campo. Por otro lado, se determinó el efecto de la fenología floral (duración y el tiempo de floración), de algunas características de la palma (la altura, el número de inflorescencias por palma y el número de flores por inflorescencia y por palma) y de la disponibilidad espacial y temporal del polen sobre la fecundidad femenina, medida esta última a través del rendimiento de frutos.

Objetivos.

1. Determinar el mecanismo de polinización de *Ch. alternans* en su hábitat natural.
2. Describir la variación de la fenología floral de los individuos de una población de *Ch. alternans* en la selva de Los Tuxtlas.
3. Estimar la variación inter-individual en la producción de frutos y determinar su relación con respecto a la fenología floral, el número y tamaño de las inflorescencias, el tamaño de la planta y la disponibilidad de flores estaminadas en individuos masculinos a diferentes distancias.

Sitio de estudio

Este trabajo se realizó en la Estación de Biología Tropical Los Tuxtlas, en un sitio permanente de 600m² (Fig. 1) en el cual se tienen individuos de *Ch alternans* marcados desde hace 10 años (Oyama, 1987).

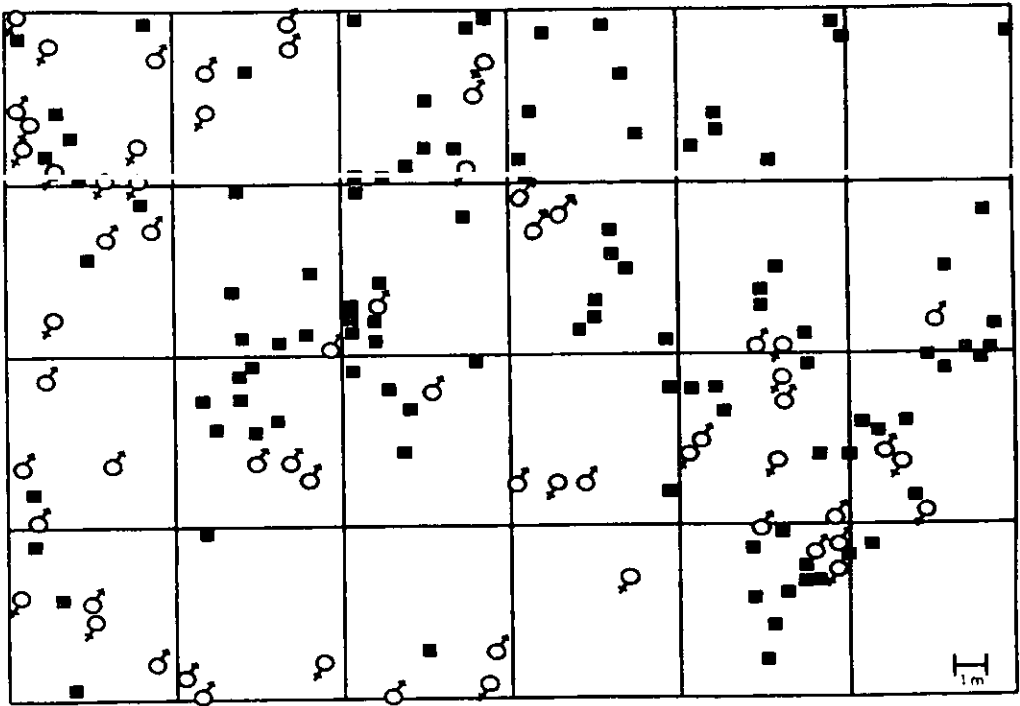


Figura 1. Ubicación de los individuos de *Ch. alternans* en un sitio de 600 m² en la selva de Los Tuxtlas, Veracruz. Los individuos que se reprodujeron durante el período de 1995-1998 se simbolizan según su sexo, el resto de los individuos se representan con cuadros.

En la figura 1 se ubica a los individuos de la población. Esta reserva biológica tiene una extensión de 640 ha, se localiza al SE de Veracruz (95°04'-09'W y 18°34'-36'N), a una altitud de 150-450 m snm. La región de Los Tuxtlas presenta un relieve principalmente volcánico de composición basáltica, algunos

de los sedimentos son arcillas tobáceas y areniscas marinas (Martin del Pozzo, 1997) El clima es cálido húmedo. del tipo Af(m)w'(i)g de acuerdo con la clasificación de García (1981). La precipitación promedio anual es de 4725 mm y la temperatura media anual de 24°C, con una oscilación media mensual de aproximadamente 7°C (Soto y Gama, 1997).

En función de la precipitación y la temperatura el año puede dividirse en tres periodos: i) la época de secas que se presenta de marzo a mayo, con una precipitación promedio de 331 mm y en donde se registran las temperaturas más altas (máxima de 35.3°C), ii) la época de lluvias que abarca de junio a octubre, con una precipitación media de 3,184 mm y temperaturas de 15.2°C a 33.5°C y iii) la época de nortes que inicia en noviembre y termina en febrero; en esta temporada es cuando se presentan los vientos húmedos más intensos del año, provenientes del norte, que contribuyen a los valores de precipitación media de 1,169 mm durante la época invernal y con las temperaturas más bajas del año (valor mínimo de 13.2°C). Los climogramas y gráficas ortogonales de viento de las estaciones meteorológicas más cercanas a la estación (Coyame, Catemaco y San Andrés Tuxtla) se presentan en Soto y Gama (1997).

Siguiendo la clasificación de Miranda y Hernández-X. (1963) el tipo de vegetación presente en la Estación corresponde a la selva alta perennifolia o bien a el bosque tropical perennifolio según la clasificación de Rzedowski (1968). La selva presenta un dosel de 30 a 35 m de altura, ocasionalmente algunos árboles llegan hasta los 40 m. Descripciones detalladas sobre la vegetación (estructura y

dinámica) y la flora se presentan en Bongers *et al.* (1988), Ibarra-Manríquez y Sinaca (1995; 1996a,b) e Ibarra-Manríquez *et al.* (1997).

A pesar de que sólo existen once especies de palmas, se trata de la forma de crecimiento más abundante en esta selva (Ibarra-Manríquez, 1988); el censo de una hectárea indica que alrededor del 45% de las plantas en esta área pertenecen a esta familia, con algunas especies con densidades de más de un millar de individuos, como es el caso de *Ch. alternans* (antes descrita como *Ch. tepejilote*) y *Astrocaryum mexicanum* (Bongers *et al.*, 1988). Una descripción de la historia natural de *Ch. alternans* se presenta en la introducción general.

Métodos.

Polinización.

Para determinar el mecanismo de polinización en *Ch. alternans* se llevaron a cabo tres tratamientos, cada uno de estos realizados en una inflorescencia distinta del mismo individuo, la asignación de cada inflorescencia a un tratamiento fue al azar. Sólo fue posible encontrar 19 palmas femeninas que presentaran tres inflorescencias en periodos similares de maduración y antes de la antesis. El primer tratamiento excluyó a los insectos de las inflorescencias por medio de una bolsa de nylon de aproximadamente 0.1mm de ancho en la abertura de la tela, que permite el paso de polen acarreado por viento pero que crea una barrera física para los insectos. El segundo tratamiento se realizó con el fin de determinar si ocurre apomixis, evitando el acceso de insectos y polen a las inflorescencias por medio de una bolsa especialmente diseñada para este efecto (Pollen-Tector

No. 1140/OT). El tercer tratamiento fue el control, en el que no se llevó a cabo ninguna manipulación experimental. Durante el período de fructificación se cuantificó el número de frutos producidos por cada inflorescencia. Para determinar si existían diferencias significativas en la producción de frutos de cada tratamiento se llevó a cabo una prueba de *t* pareada, debido a que en el tratamiento de exclusión de polen no hubo producción de frutos. Paralelamente, se llevaron a cabo observaciones diurnas de los insectos visitantes, cada seis días a lo largo de todo el período de floración de todos los individuos reproductivos dentro del sitio de estudio.

Fenología reproductiva.

La fenología floral incluye el seguimiento o cuantificación desde la iniciación del bulbo o yema floral, el período de antesis y la persistencia floral (Rathcke y Lacey, 1985). Este estudio se referirá a la floración limitada al período de antesis durante el cual se lleva a cabo la polinización. Se observó la fenología de 440 inflorescencias producidas por un total de 62 plantas reproductivas de *Ch. alternans* cada seis días durante el período reproductivo de la especie (octubre de 1995 a enero de 1996). Se registró la altura de cada una de las 62 plantas reproductivas. Para evitar confusión en el seguimiento de las inflorescencias en la misma palma, cada una de éstas se marcaron con etiquetas. Para determinar la duración de las inflorescencias individuales se llevaron a cabo observaciones diarias durante 2 períodos de 15 días (del 31 de octubre al 14 de noviembre y del 20 de noviembre al 5 de diciembre). En cada observación se registró el número de inflorescencias considerando únicamente a las que se encontraban en antesis

Debido a la disposición y alta densidad de las flores en las inflorescencias, su conteo es un proceso necesariamente destructivo. Por lo anterior, se realizó una estimación del número de flores de las inflorescencias de los individuos localizados dentro del sitio, mediante un análisis de regresión entre la longitud del raquis y el número de flores en un muestreo de inflorescencias de individuos masculinos (n=38) y femeninos (n=72) creciendo fuera del sitio de estudio. De esta manera, para cada inflorescencia experimental se registró la longitud de cada raquis y se estimó el número de flores. Para determinar si existen diferencias entre sexos en la producción de flores por inflorescencia y por individuo, de inflorescencias y en la duración de la inflorescencia en anthesis y se llevó a cabo una prueba no paramétrica de Mann-Whitney.

Durante el período de fructificación de 1996 se cuantificó el número de frutos por infrutescencia de los 25 individuos femeninos reproductivos. Para cada infrutescencia se obtuvo el rendimiento de frutos. Para determinar la relación entre el tamaño de la palma (medido como la longitud del tallo) con la producción de estructuras reproductivas (Inflorescencias, flores, infrutescencias y rendimiento de frutos) y la producción de inflorescencias y flores sobre el rendimiento de frutos, se llevaron a cabo modelos lineales paramétricos. El ajuste a estos modelos se llevó a cabo con regresión por mínimos cuadrados.

Finalmente, con el propósito de evaluar si la distancia a la fuente de polen afecta el rendimiento de frutos, se relacionó el número de flores e inflorescencias estaminadas coincidentes en floración con cada palma femenina y el rendimiento

de frutos para distintos radios de distancia. Estas relaciones se determinaron mediante modelos lineales paramétricos, ajustados por mínimos cuadrados

Resultados

Polinización

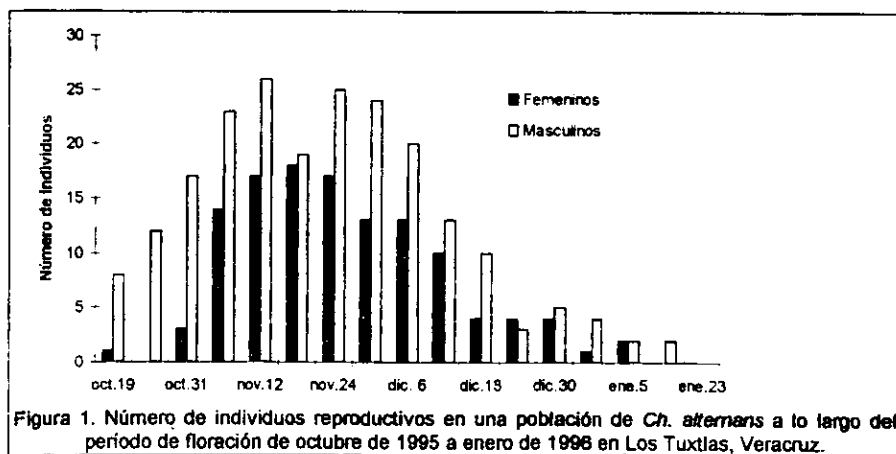
Ninguna de las inflorescencias excluidas de las fuentes de polen produjo frutos, lo cual indica que en *Ch. alternans* el fenómeno de apomixis no se presenta. La exclusión de los insectos visitantes a las inflorescencias no inhibió la producción de frutos. La producción de frutos para el control fue de 70 (± 7.1) y para el tratamiento en el que se excluyeron a los insectos fue de 70.59 (± 6.08), de manera que no se presentan diferencias significativas entre estos tratamientos ($P < 0.05$).

En las inflorescencias pistiladas no se observó ningún insecto visitante a lo largo del periodo de floración. Los insectos visitantes presentes en las inflorescencias estaminadas fueron thysanópteros y escarabajos aún no identificados.

Fenología reproductiva

En *Ch. alternans* el periodo de floración de la población fue de mediados de octubre de 1995 a mediados de enero de 1996. La frecuencia de los individuos con flores a través de este periodo mostró una distribución unimodal (Fig. 1) El pico de la floración se presentó durante la segunda quincena de noviembre. La probabilidad reproductiva de la población fue de 0.37 durante este periodo, es decir que de los 166 individuos de la población sólo 62 se reprodujeron (37

masculinos y 25 femeninos). Con excepción de dos registros (dic.24 y ene 5), la frecuencia de individuos masculinos reproductivos observada fue siempre mayor que el de femeninos, dándose inclusive una situación extrema en dos registros donde no se presentaron plantas femeninas reproductivas (Fig. 1). En los cuadros 2 y 3 se observa la variación inter-individual en la producción de inflorescencias y los períodos de floración de la población estudiada. Ambos atributos varían ampliamente. La amplitud de la floración por individuo varió entre 2 y 39 días. El número de inflorescencias producidas también fue muy variable; los individuos femeninos produjeron entre 1 y 12 inflorescencias y los masculinos entre 1 y 23. En ambos sexos sólo algunos individuos son los que contribuyen de manera significativa a la producción de inflorescencias totales de la población. De igual forma, sólo cinco individuos contribuyen con más del 70% de los frutos producidos durante este período reproductivo.



Cuadro 2. Número de inflorescencias de los individuos femeninos de *C. affernans* presentes en cada fecha de registro. Número total de inflorescencias, duración total de la floración, infruflorescencias y frutos producidos por cada individuo en la selva de Los Tuxtlas. La secuencia de los individuos obedece al tiempo en el que comenzaron a producir inflorescencias.

	Octubre			Noviembre			Diciembre			Enero			Inflorescencias	Días en		Frutos					
	19	25	31	6	12	18	24	30	6	12	18	24		30	5		11	17	floración	Infruflorescencias	
F20	1			2	2													11	39	11	917
F15			1	3	6	4	3	3										10	20	10	360
F1			1	1	2	1	1	1										2	23	1	32
F21				6	8	2	2	3	1	3	1							12	46	10	307
F24				4	5	1	3	1										9	25	4	60
F12				2	2	5	3	5	3									10	33	7	288
F18				2	4	2	2	1					1					7	35	1	6
F16				1	3	4	4	4	1					1				5	31	7	68
F22				1	3	4	4	3	1	1								7	24	4	4
F11				1	2	2	1	1										2	22	2	100
F25				1	2	1	1	1										4	19	1	3
F4				1	1	1	1	1		1	1	1						3	31	2	8
F2				1	1	1	1	1										1	13	1	46
F7														1				2	18	2	45
F13					7	3	4	1	1	1								9	23	9	324
F19					3	3	3	1	1	1				1				7	26	7	246
F8					1	1	1	2	3	1								3	22	3	69
F14					1	1	1	1										1	10	1	7
F23																		1	6	1	19
F9																		1	11	0	4
F10																		2	7	2	12
F5																		1	16	2	29
F17																		1	3	0	0
F3																		1	4	1	6

‡ El individuo murió antes de la época de fructificación

Cuadro 3. Número de inflorescencias de los individuos de *Ch. alternans* presentes en cada fecha de registro, así como el total de inflorescencias producidas y la duración total de la floración para cada individuo masculino en la selva de "Los Tuxtles". La secuencia de los individuos obedece al tiempo en el que comenzaron a producir inflorescencias.

	Octubre			Noviembre				Diciembre				Enero			inflorescencias	Floración en días		
	19	25	31	6	12	18	24	30	6	12	18	24	30	5			11	17
M29	6	4		2	1	1	2	3	4	4							22	25
M37	3		1	1	1	2	1	1	3								11	16
M19	2	2	3	5	3	1	3	2	1	1	1		2				20	27
M11	2	1		1	3			1	1		1						9	16
M13	1	1	1	2			2		1								7	16
M7	1	1		1	4		1	1									8	15
M32	1			2	3	2	1	1									10	14
M23	1			2	1	2	1	1	2	1							9	14
M30		3	3	2	2											2	11	11
M24			5	2	2	2	1	1	2	2							14	12
M28	1	3	1	1	2	4	2	1	3	4			1	2		2	23	30
M18	1	3		1			2	1		2			1	2	1		14	20
M20	1	2	2	4			3			1							13	18
M16	1	2	2	3	2	2											8	13
M24	1	2	2			1											5	11
M25		3	4	1	2	3	1										9	14
M5		1	7	7	1	1	1										15	18
M22		1	3	1		1	1	1	1	2							9	19
M14		1	2	2	1				1								5	14
M8		1	2	1		1		1	1								6	15
M4			1		1	2	1	2	1								6	13
M38				2													2	2
M31			1	1	1	4	2	2	1								9	17
M3			1	1													1	2
M2				1			2	1	2								6	11
M1					1	2	2	1	1	2							10	17
M27					1	1	4	6	8	1	1	2	1	3			22	28
M26					1	1	2	1									4	11
M10					1	1	1	2	1			1				1	8	17
M12					1	1						1					3	6
M6					1												1	2
M35						2	1	1	2								5	8
M21						1	1	1	3	2	2	1	1				10	21
M17						1											1	2
M33							1	1	4					1			6	10
M9							1										1	4
M15								1									1	3

En consecuencia con lo anterior, en la población el número de inflorescencias estaminadas fue mayor que el de pistiladas durante casi todo el período (Fig. 2). Durante el pico de la floración se invirtieron ligeramente estas diferencias, lo cual puede atribuirse a la duración de cada estado sexual (Cuadro 4). Esto se refuerza al observar la producción de inflorescencias nuevas ya que la producción de inflorescencias estaminadas es siempre mayor que el de pistiladas (Fig 3).

Cuadro 4. Resultados de la prueba de Mann-Whitney para las diferencias en la producción de inflorescencias y flores (número de individuos entre paréntesis); así como los días de duración de la inflorescencia con flores en antesis entre plantas masculinas y femeninas, en una población de *Ch. alternans* en los Tuxtías.

Característica	Machos	Hembras	z	P
	Media	± e.e.		
Inflorescencias (62)	8.8 ± 2.5	4.6±2	2.76	*
Flores/inflorescencia (62)	790.8±19.9	181±10.7	5.11	*
Flores/individuo (62)	8817.7±33	858.37±22	4.45	*
Duración (244 inflorescencias)	2.8 ± 0.9	8.3±1.8	-11.14	*

* P<0.05

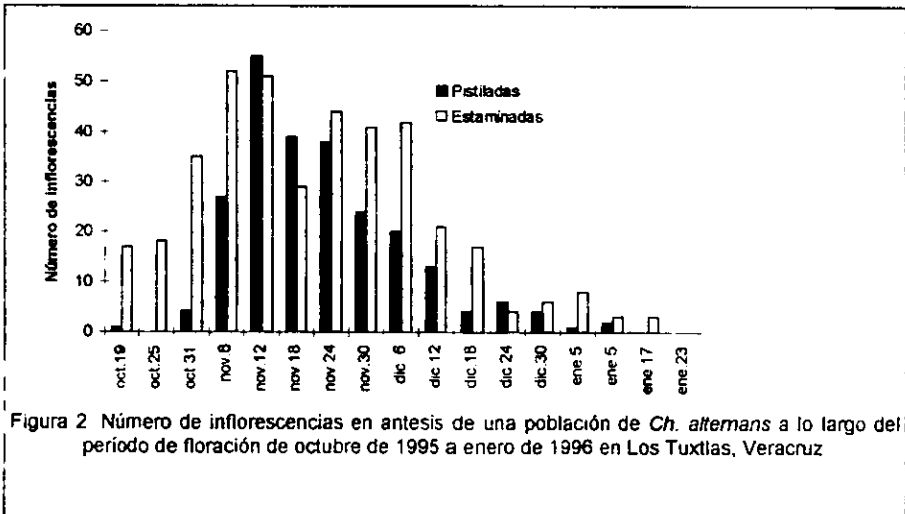
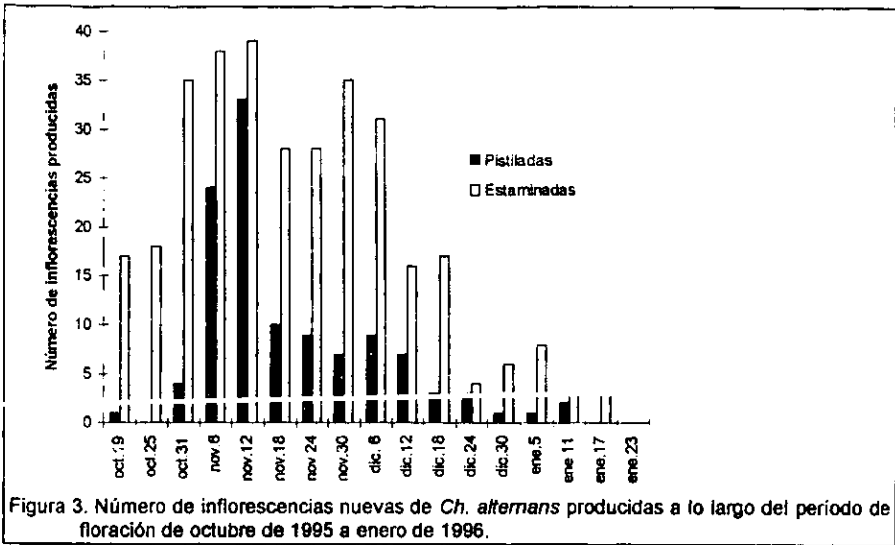
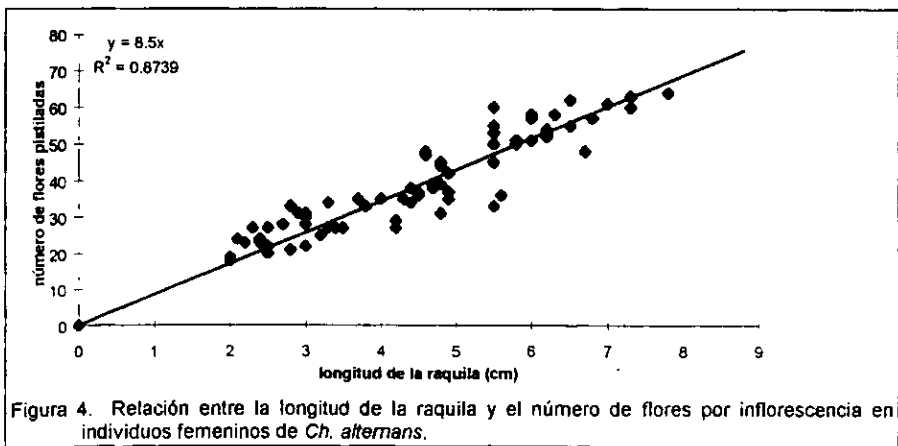
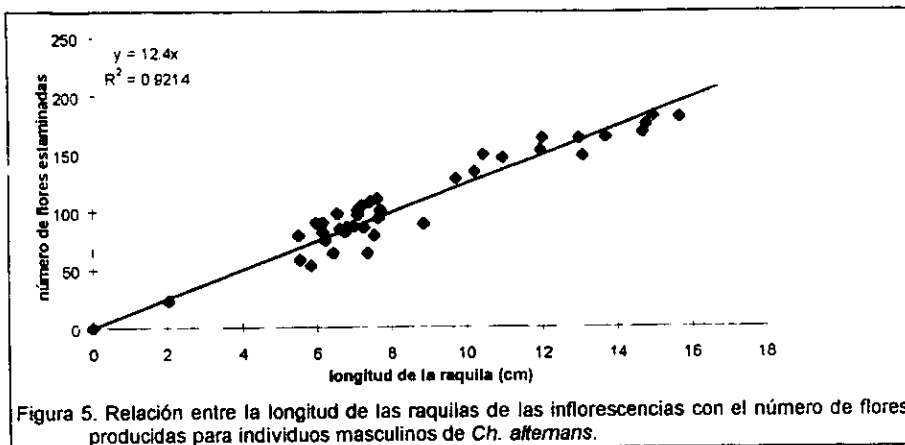


Figura 2 Número de inflorescencias en antesis de una población de *Ch. alternans* a lo largo del período de floración de octubre de 1995 a enero de 1996 en Los Tuxtías, Veracruz



En las figuras 4 y 5 se muestran los modelos lineales y el coeficiente de correlación para la longitud de la raquila y el número de flores producidas por inflorescencias pistiladas y estaminadas, respectivamente. Estos modelos fueron utilizados para la estimación del número de flores.





Las palmas masculinas fueron más abundantes que las palmas femeninas en una proporción de 37:25. Esta proporción no fue significativamente distinta de la proporción esperada 1:1 ($\chi^2=2.32$, 1g.l). Por otro lado, la producción de inflorescencias, flores por inflorescencia y flores totales fue significativamente mayor en los machos que en las hembras (Cuadro 4).

No se produjeron frutos en 27% de las inflorescencias producidas por los individuos femeninos. El número total de frutos de la población fue de 2,716 de un total estimado de 21,374 flores. El número promedio de frutos por infrutescencia fue de 33 (± 5.0 e.e., n=83). El rendimiento de frutos por infrutescencias fue de 0.13 (± 0.27 e.e., n=83). En el cuadro 5 se observa que las plantas con mayor longitud de tallo produjeron más inflorescencias. Sin embargo, la ventaja de producir más inflorescencias e infrutescencias en las plantas de mayor altura no se reflejó directamente en el rendimiento de frutos. No obstante, existe una relación significativa entre la producción de inflorescencias y flores con el rendimiento de frutos.

Cuadro 5. Valores del coeficiente de correlación (r^2) para la relación de la longitud del tallo (LT) con la producción de estructuras reproductivas y para la producción de flores, inflorescencias y la duración total de la floración (días) con el rendimiento de frutos de *Ch. alternans* en la selva de Los Tuxtlas, Veracruz.

Regresión lineal	r^2	n	P
LT vs. inflorescencias masculinas	0.111	35	*
LT vs. inflorescencias femeninas	0.262	25	*
LT vs. infrutescencias	0.212	23	*
LT vs. Rendimiento de frutos	0.072	22	n.s.
Inflorescencias vs. rendimiento de frutos	0.298	22	*
Flores vs. Rendimiento de frutos	0.239	22	*
Duración vs. rendimiento de frutos	0.004	22	n.s.

* P < 0.05

La disponibilidad espacial de polen a radios de distancia de 5 a 7 m afectó significativamente el rendimiento de frutos. La disponibilidad de flores o inflorescencias estaminadas por debajo o más allá de estos radios de distancia no tuvieron efectos significativos. Este efecto fue más marcado evaluando del número de flores que el de inflorescencias (Fig. 6). En la figura 7 se muestra el incremento en el rendimiento de frutos conforme aumenta el número de flores estaminadas en un radio de vecindad de 5m.

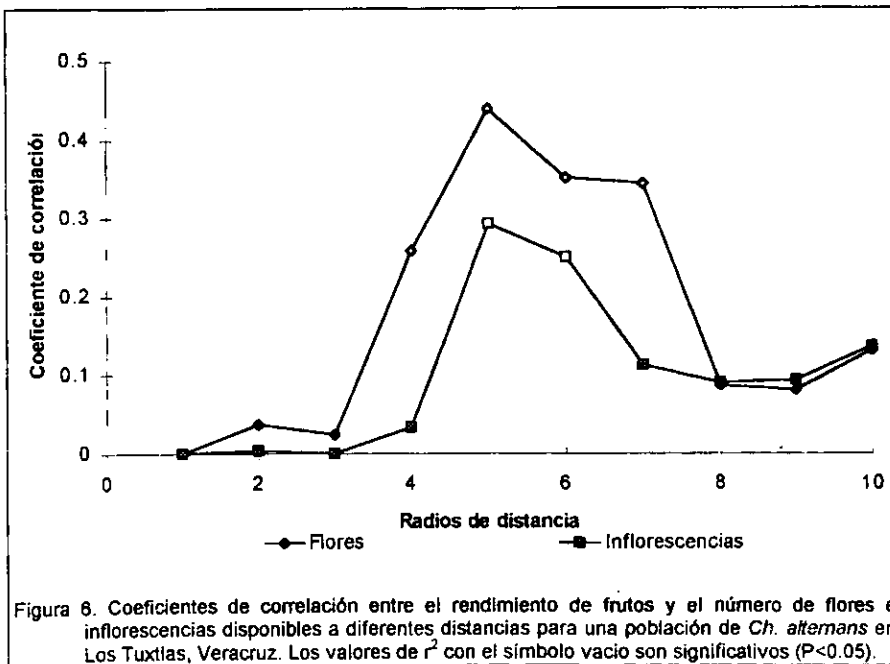


Figura 6. Coeficientes de correlación entre el rendimiento de frutos y el número de flores e inflorescencias disponibles a diferentes distancias para una población de *Ch. alternans* en Los Tuxtlas, Veracruz. Los valores de r^2 con el símbolo vacío son significativos ($P < 0.05$).

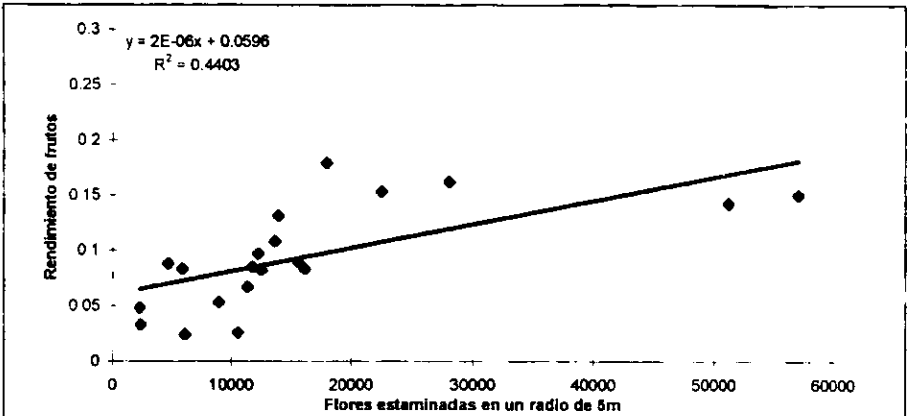


Figura 7. Relación entre el número de flores estaminadas en un radio de vecindad de 5m y el rendimiento de frutos de *Ch. alternans* en la selva de Los Tuxtlas.

Por otro lado, también se observa un efecto de la disponibilidad temporal de polen sobre el rendimiento de frutos (Fig. 8). Si no se consideran los registros de principios y finales del período de floración, en los que únicamente se produjo una infrutescencia (octubre 19; diciembre 24, 3 y enero 11), las inflorescencias producidas durante el pico de floración de la población presentaron mayores niveles en el rendimiento de frutos.

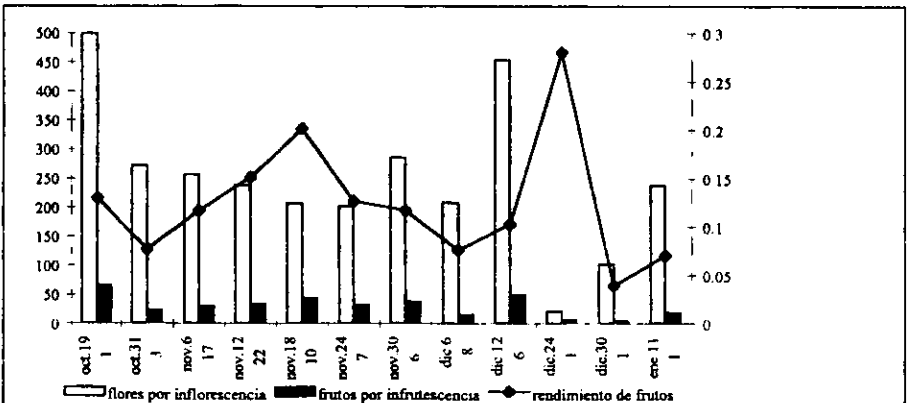


Figura 8. Variación en el número de flores, en el número de frutos (eje Y1) y en el rendimiento de frutos (eje Y2) para las inflorescencias producidas a lo largo del período de floración. A un costado de cada fecha se presenta el número de infrutescencias producidas.

Discusión

Polinización

Las características florales, la alta densidad poblacional y los resultados del experimento de polinización, además de las observaciones de campo son evidencias que apoyan la anemofilia de *Ch. alternans* esta palma, lo que confirma lo supuesto por Bawa y Crisp (1980) para el género *Chamaedorea* y en particular para esta especie, por Oyama (1987). Aún cuando uno de los experimentos fue una barrera física que impide el acceso de los animales a las inflorescencias estaminadas, no se encontraron diferencias significativas en el número de frutos producidos por estas inflorescencias y el control, de manera que es más probable que los animales observados desempeñen una función como depredadores de polen que como polinizadores, lo cual coincide con los resultados de trabajos desarrollados previamente para otras especies anemófilas (Bullock. 1994). Si bien se observaron algunos insectos thysanópteros y escarabajos durante este período de floración y trigonas en períodos anteriores (L. Eguiarte, com.pers.) como visitantes de la especie, éstos animales sólo se registraron en las inflorescencias estaminadas. Durante el periodo de floración no se observaron insectos visitantes en las inflorescencias pistiladas, incluyendo observaciones durante períodos nocturnos (G. Ibarra, com. pers.).

Fenología reproductiva

La fenología floral de *Ch. alternans* observada a nivel poblacional durante el período de 1995-1996 concuerda con los datos fenológicos obtenidos en trabajos anteriores (Carabias-Lillo, 1985; Oyama, 1987). Siguiendo la clasificación de fenología vegetal sugerida por Newstrom y Frankie (1994), la floración de esta población es claramente anual y manifiesta un patrón regular. Se requiere de observaciones por un mayor número de años para determinar si este patrón se cumple a nivel individual. Su floración se inicia a finales del período de mayor precipitación durante la época de nortes, cuando los vientos son más intensos.

Durante esta época, las condiciones ambientales de precipitación y humedad relativa puede estar limitando el transporte de polen por el viento. Otro factor que puede estar afectando la anemofilia en *Ch. alternans* es la estructura de la vegetación, la cual crea barreras físicas que impiden fuertes corrientes de viento dentro el sotobosque.

Sólo cinco individuos femeninos y ocho masculinos (20%) contribuyen con el 45% de las inflorescencias producidas por la población. Estos cinco individuos femeninos contribuyen con cerca del 75% de la producción de frutos, lo que implica que una fracción muy pequeña de la población contribuye en gran medida a la cohorte de semillas producidas durante el año de estudio. Se requiere de más años de estudio para entender si tal dominancia se manifiesta en la estructura genética de la población de manera persistente.

Rendimiento de frutos

Las plantas por lo general producen un mayor número de flores que las que se pueden desarrollar hasta frutos. En *Ch. alternans* algunas inflorescencias no se desarrollaron a infrutescencias, como ha sido reportado para *Acromia aculeata*, otra especie de palma (Scariot y Lleras, 1995). Se presentaron tres diferentes circunstancias que disminuyeron la producción de infrutescencias en esta población de *Ch. alternans*: i) la palma reproductiva de menor longitud y una de las más altas produjeron una sola inflorescencia cada una, las cuales no llegaron a desarrollarse hasta infrutescencias, ii) en siete palmas con más de una inflorescencia sólo se desarrollaron a infrutescencias el 50% en promedio (14-83%), y iii) un individuo femenino con cinco inflorescencias murió entre el período de floración y el de fructificación.

El rendimiento de frutos observado en *Ch. alternans* fue de 0.13. Este rendimiento fue similar al encontrado en períodos reproductivos anteriores (Oyama, 1987) y es menor que el reportado para otras especies de palmas (Cuadro 1). Este rendimiento es muy similar al reportado para *Acromia aculeata* otra especie anemófila y menor al encontrado en las otras especies de palmas las

cuales son polinizadas por animales. *Calyptrogyne ghiesbreghtiana* es polinizada por murciélagos y *Astrocarium mexicanum* y *Orbignya phalerata* por insectos. Esta comparación confirma que la polinización por viento puede ser considerada menos eficiente.

La variación en el rendimiento de frutos observado en la población no responde a la altura de la palma. Las palmas de mayor tamaño, capaces potencialmente de captar una mayor cantidad de recursos, no presentaron una mayor producción de frutos. Lo anterior nos permite sugerir que el rendimiento de frutos no está limitado por recursos (por ejemplo: nutrientes, luz). En plantas dioicas con entrecruzamiento obligado la limitación de polen ha sido citada como un factor que afecta el rendimiento de semillas y frutos, particularmente en plantas polinizadas por viento o por animales poco especializados (Bierzuchudek, 1981; Hainsworth *et al.*, 1985; Ayre y Whelan, 1989; Fox, 1992; Weis y Hermanutz, 1993; Cunningham, 1996). Para *Ch. alternans* dos hechos señalan que el éxito reproductivo femenino puede estar limitado por el polen: i) el incremento significativo en el rendimiento de frutos en función del número de flores estaminadas disponibles a una distancia de 5 a 7m y ii) el producir inflorescencias durante el pico de floración, cuando la cantidad de polen disponible es mayor, se refleja en una ventaja en el rendimiento de frutos. Sin embargo, la evidencia de que una mayor disponibilidad temporal de polen incrementa el rendimiento de frutos no necesariamente refleja una limitación por polen ya que su efecto se confunde con otras variaciones temporales en el ambiente. Se ha hecho notar que para probar si existe una limitación de polen es necesario llevar a cabo experimentos de polinización con polen compatible y viable (Fox, 1992; Cunningham, 1996).

En conclusión, los resultados de este trabajo dan evidencia que apoya la anemofilia en *Ch. alternans*. Las observaciones fenológicas indican que la floración de la población de *Ch. alternans* en la selva de "Los Tuxtlas" es claramente anual y con un patrón regular, cuya duración va de mediados de octubre a finales de enero. Existe una gran variación en el rendimiento de frutos

entre los individuos de *Ch. alternans*. A manera de hipótesis se puede proponer que tal variación responde a la disponibilidad de polen más que a una limitación en los recursos.

Algunos aspectos importantes para estudiar en el futuro serían los siguientes: ¿Cuál es la distancia real de dispersión de polen?. ¿qué relación existe entre ésta y la distancia a la cual se encontró un efecto sobre el rendimiento de frutos?, esta podría ser investigada mediante la tinción y seguimiento del polen y por otro lado podría investigarse el flujo efectivo de polen mediante el uso de marcadores moleculares y análisis de paternidad. ¿por qué la producción de frutos esta dada sólo por una pequeña fracción de la población?, en *Ch. alternans* los individuos con una mayor fecundidad femenina son los mismos durante periodos reproductivos consecutivos, ¿qué tan frecuente es esto en otras especies?

Referencias

- Allison, T. 1990. Pollen production and plant density affect pollination and seed production in *Taxus canadensis*. *Ecology* **71**:516-522.
- Anderson, A.B. y W.L. Overall. 1988. Pollination ecology of a forest-dominant palm (*Orbignya phalerata* Mart.) in northern Brazil. *Biotropica* **20**:192-205
- Augspurger, C.K. 1980. Mass-flowering of a tropical shrub (*Hybanthus prunifolius*): Influence on pollinator attraction and movement. *Evolution* **34**:475-488.
- Augspurger, C.K. 1981. Reproductive synchrony of a tropical shrub: experimental studies on effects of pollinators and seed predators on *Hybanthus prunifolius* (Violaceae). *Ecology* **62**:775-788.
- Ayre, D.J. y R.J. Whelan. 1989. Factors controlling fruit set in hemaphroditic plants: studies with the Australian Proteaceae. *Trends in Ecology and Evolution* **4**:267-272.
- Baker, H.G., K.S. Bawa, G.H. Frankie y P.A. Opler. 1983. Reproductive biology of plants in tropical forest. En: Golley, F.B. (ed.). *Tropical Rain Forest Ecosystems*. 183-215pp.
- Bawa, K.S. 1974. Breeding systems of tree species of a lowland tropical community. *Evolution* **28**: 85-92.
- Bawa, K.S. y J.E. Crisp. 1980. Wind pollination in the understory of a rain forest in Costa Rica. *Journal of Ecology* **68**:871-876.
- Bernal, R. y F. Ervik. 1996. Floral biology and pollination of the dioecious palm *Phytelephas seemannii* in Colombia: an adaptation to *Staphylinid* Beetles. *Biotropica* **28**:682-696.
- Bierzychudek, P. 1981. Pollinator limitation of plant reproductive effort. *American Naturalist* **117**:838-840.
- Bongers, F., J. Popma, J. Meave y J. Carabias. 1988. Structure and floristic composition of the lowland rain forest of Los Tuxtlas, Mexico. *Vegetatio* **74**:55-80.
- Bullock, S.H. 1981. Notes on the phenology of inflorescences and pollination of some rain forest palms in Costa Rica. *Principes* **25**:101-105.
- Bullock, S.H. 1994. Wind pollination of neotropical dioecious trees. *Biotropica* **26**:172-179.
- Carabias-Lillo, J. y S. Guevara S. 1985. Fenología de una selva tropical húmeda y en una comunidad derivada; Los Tuxtlas, Veracruz. En: Gómez-Pompa A. y S. del Amo (eds.) *Investigaciones sobre la regeneración de selvas altas en Veracruz, México*. Vol. II. INIREB y Alhambra. México. pp 27-66.
- Collinge, S.K. y S.M. Louda. 1989. Influence of plant phenology on the insect herbivore/bittercress interaction. *Oecologia* **79**:111-116.
- Corlett, T.R. 1990. Flora and reproductive phenology of the rain forest at Bukit Timah, Singapore. *Journal of Tropical Ecology* **6**:55-63.
- Cunningham, S.A. 1996. Pollen supply limits fruit initiation by a rain forest understorey palm. *Journal of Ecology* **84**:185-194.
- de Steven, D., D.M. Windsor, F.E. Putz y B. de León. 1987. Vegetative and reproductive phenologies of a palm assemblage in Panama. *Biotropica* **19**:342-356

- Feil, J.P. 1992. Reproductive ecology of dioecious *Siparuna* (Monimiaceae) in Ecuador -a case of gall midge pollination. *Botanical Journal of the Linnean Society* 110:171-203.
- Fox, J.F. 1992. Pollen limitation of reproductive effort in willows. *Oecologia* 90:283-287.
- Frankie, G.W., H.G. Baker y P.A. Opler. 1974. Comparative phenological studies of trees in tropical wet and dry forest in the lowlands of Costa Rica. *Journal of Ecology* 62:881-919.
- Fripp, Y.J., A.R. Griffin y G.F. Moran. 1986. Variation in allele frequencies in the outcross pollen pool of *Eucalyptus regnans* F Muell throughout a flowering season. *Heredity* 59:161-171.
- Galen, C. y M. Stanton. 1991. Consequences of emergence phenology for reproductive success in *Ranunculus adoneus* (Ranunculaceae). *American Journal of Botany* 78:978-988.
- García, E. 1981. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Koeppen (para adaptarlo a las condiciones de la República Mexicana) 3a. ed. Larios, México.
- Gentry, A.H. 1974. Flowering phenology and diversity in tropical Bignoniaceae. *Biotropica* 6:64-68.
- Gentry, A.H. y L.H. Emmons. 1987. Geographical variation in fertility, phenology, and composition of the understorey of neotropical forest. *Biotropica* 19:216-227.
- Gutián, J., P. Gutián y Luis Navarro. 1996. Fruit set, fruit reduction, and fruiting strategy in *Cornus sanguinea* (Cornaceae). *American Journal of Botany* 83:744-748.
- Hainsworth, F.R., L.L. Wolf y T. Mercier. 1985. Pollen limitation in a monocarpic specie, *Ipomopsis aggregata*. *Journal of Ecology* 73:263-270.
- Heideman, P.D. 1989. Temporal and spatial variation in the phenology of flowering and fruiting in a tropical rainforest. *Journal of Ecology* 77:1059-1079.
- Henderson, A. 1984. Observations on pollination of *Cryosophila albida*. *Principes* 28:120-126.
- Hodel, D.R. 1992. *Chamaedorea palms. The species and their cultivation* Allen Press, Lawrence, Kansas.
- Honig, M.A., H.P. Linder y W. J. Bond. 1992. Efficacy of wind pollination: pollen load size and natural microgametophyte populations in wind-pollinated *Staberoha banksii* (Restionaceae). *American Journal of Botany* 79:443-448.
- House, S.M. 1992. Population density and fruit set in the three dioecious tree species in Australian tropical rain forest. *Journal of Ecology* 80:57-69.
- Ibarra-Manríquez, G. 1988. The palms of a tropical rain forest in Veracruz, México. *Principes* 32:147-155.
- Ibarra-Manríquez, G. 1992. Fenología de las palmas de una selva calido-húmeda de México. *Bulletin del' Institut Francais D'etudes Andines* 21:669-683.
- Ibarra-Manríquez, G. y S. Sinaca C. 1995. Lista florística comentada de plantas de la Estación de Biología Tropical "Los Tuxtlas", Veracruz, México. *Revista de Biología Tropical* 43:75-115.

- Ibarra-Manríquez, G. y S. Sinaca C. 1996a. Estación de Biología Tropical "Los Tuxtlas", Veracruz, México: Lista florística comentada (Mimosaceae a Verbenaceae). *Revista de Biología Tropical* **44**:41-60.
- Ibarra-Manríquez, G. y S. Sinaca C. 1996b. Lista comentada de plantas de la Estación de Biología Tropical "Los Tuxtlas", Veracruz, México: (Violaceae-Zingiberaceae). *Revista de Biología Tropical* **44**:427-447.
- Ibarra-Manríquez, G., B. Sánchez-Garfias y L. González-García. 1991. Fenología de lianas y árboles anemócoros en una selva cálida-húmeda de México. *Biotropica* **23**:242-254.
- Ibarra-Manríquez, G., M. Martínez-Ramos, R. Dirzo y J. Nuñez-Farfán. 1997. La vegetación de Los Tuxtlas: ecología y conservación. En: E. González S., R.C. Vogt y R. Dirzo (eds.). *La Historia Natural de Los Tuxtlas*. Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- Ippolito, A. y J.E. Armstrong. 1993. Floral biology of *Hornstedtia scottiana* (Zingiberaceae) in a lowland rain forest of Australia. *Biotropica* **25**:201-209.
- Kunin, W.E. 1992. Density and reproductive success in wild populations of *Diplotaxis eruroides* (Brassicaceae). *Oecologia* **91**:129-133.
- Kunin, W.E. 1993. Sex and the single mustard: population density and pollinator behavior effects on seed-set. *Ecology* **74**:2145-2160.
- Lacey, E.P. y R. Pace. 1983. Effect of parental flowering and dispersal times on offspring fate in *Daucus carota* (Apiaceae). *Oecologia* **60**:274-278.
- Lieberman, D. 1982. Seasonality and phenology in a dry tropical forest in Ghana. *Journal of Ecology* **70**:791-806.
- Mack, A.L. 1997. Spatial distribution, fruit production and seed removal of rare, dioecious canopy tree species (*Aglaia* aff. *flavida* Merr. et Perr.) in Papua New Guinea. *Journal of Tropical Ecology* **13**:305-316.
- Martin del Pozzo, A.L. 1997. Geología. En: E. González S., R.C. Vogt y R. Dirzo (eds.). *La Historia Natural de Los Tuxtlas*. Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- McNeilly, T. y J. Antonovics. 1968. Evolution in closely adjacent plant populations. IV. Barriers to gene flow. *Heredity* **23**:215-218.
- Miranda, F. y E. Hernández-X. 1963. Los tipos de vegetación de México y su descripción. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* **28**:29-178.
- Newstrom, L.E. y G.W. Frankie. 1994. A new classification for plant phenology based on flowering patterns in lowland tropical rain forest trees at La Selva, Costa Rica. *Biotropica* **26**:141-159.
- Opler, P.A., H.G. Baker y G.W. Frankie. 1975. Reproductive biology of some Costa Rican *Cordia* species (Boraginaceae). *Biotropica* **7**: 234-247.
- Opler, P.A., G.W. Frankie, H.G. Baker. 1980. Comparative phenological studies of treelet and shrub species in tropical wet and dry forest in the lowlands of Costa Rica. *Journal of Ecology* **68**:167-188.
- Opler, P.A., G.W. Frankie, H.G. Baker. 1991. Seasonality of climber communities: a review and example from Costa Rica dry forest. En: Putz, F.E. y H.A. Mooney (eds.). *The Biology of Vines*. pp:377-392.
- Oyama, K. 1987. Demografía y dinámica poblacional de *Chamaedorea tepejilote* Liebm. (Palmae) en la selva de Los Tuxtlas, Veracruz (México). Tesis de Maestría en Ciencias, Facultad de Ciencias, UNAM. México.

- Oyama, K. 1997. *Chamaedorea tepejilote*. En: González-Soriano, E., R. Dorzo y R.C. Vogt (eds.) *Historia Natural de Los Tuxtlas*. Universidad Nacional Autónoma de México, México. pp:107-109
- Platt, W.J., G.R. Hill y S. Clark. 1974. Seed production in a prairie legume (*Astragalus canadensis* L.). *Oecologia* 17:55-63.
- Putz, F.E. y D.M. Windsor. 1987. Liana phenology on Barro Colorado Island Panama. *Biotropica* 19:334-341.
- Rathcke B. y E.P. Lacey. 1985. Phenological patterns of terrestrial plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* 16:179-214.
- Roach, D.A. 1986. Timing of seed production and dispersal in *Geranium carolinianum*: effects on fitness. *Ecology* 67:572-576.
- Rzedowski, J. 1968. *Vegetación de México*. Limusa. México. 432 pp.
- Scariot, A. y E. Lleras. 1995. Flowering and fruiting phenologies of the palm *Acromia aculeata*: Patterns and consequences. *Biotropica* 27:168-173.
- Schmitt, J. 1983. Individual flowering phenology, plant size, and reproductive success in *Linanthus androsaceus*, a California annual. *Oecologia* 59:135-140.
- Silander, J.A.J. 1978. Density-dependent control of reproductive success in *Cassia biflora*. *Biotropica* 10:292-296.
- Soto, M. y L. Gama. 1997. Climas. En E. González S., R.C. Vogt y R. Dirzo (eds.), *La Historia Natural de Los Tuxtlas*. Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- Sutherland, S. 1986. Floral sex ratios, fruit-set, and resource allocation in plants. *Ecology* 67:991-1001.
- Sutherland, S. 1986. Patterns of fruit-set: what controls fruit-flower ratios in plants? *Evolution* 40:117-128.
- van Schaik, C.P., J.W. Terborgh y S.J. Wright. 1993. The phenology of tropical forest: Adaptive significance and consequences for primary consumers. *Annual Review of Ecology and Systematics* 24:353-377.
- Venable, L. 1992. Size-number trade-off and variation of seed size with plant resource status. *American Naturalist* 140:287-304.
- Vieira, M.F. y R.M. de Carvalho-Okano. 1996. Pollination biology of *Mabea fistulifera* (Euphorbiaceae) in Southeastern Brazil. *Biotropica* 28:61-68.
- Weis, I.M. y L.A. Hermanutz. 1993. Pollination dynamics of arctic dwarf birch (*Betula glandulosa*; Betulaceae) and its role in the loss of seed production. *American Journal of Botany* 80:1021-1027.
- Winsor, J.A., L.E. Davis y A.G. Stephenson. 1987. The relationship between pollen load and fruit maturation and the effect of pollen load on offspring vigor in *Cucurbita pepo*. *American Naturalist* 129:643-656.
- Wulff, R.D. 1986. Seed size variation in *Desmodium paniculatum* | Factors affecting seed size. *Journal of Ecology* 74:87-97
- Zimmerman, M. 1984. Reproduction in *Polemonium*: a five year study of seed production and implications for competition for pollinator service. *Oikos* 41:225-228.

CAPÍTULO 3.

VARIACIÓN GENÉTICA DE *Chamaedorea alternans*
H. A. WENDL. Y SU RELACIÓN CON ALGUNOS
PARAMETROS DEMOGRÁFICOS EN LA SELVA
TROPICAL DE LOS TUXTLAS

Resumen

Se describen la variación y estructura genética a nivel de ADN de una población de la palma *Chamaedorea alternans* de la selva de "Los Tuxtlas" revelada por medio de los marcadores moleculares RAPDs. Se analiza la relación entre la variación genética y algunos parámetros demográficos como categorías de edad, tamaño, producción de estructuras reproductivas y sexo. Se amplificaron un total de 53 fragmentos con 5 oligonucleótidos. El polimorfismo fue de 0.75 en los individuos adultos y de 0.89 cuando se incluyeron los datos de las plántulas. La probabilidad de encontrar 2 palmas adultas con el mismo patrón de bandeo fue de 1.5×10^{-11} con los 5 oligonucleótidos utilizados. Los elevados niveles de diversidad genética ($H=0.35$, $I=0.52$) encontrados pueden ser mantenidos por el flujo génico causado por la dispersión de las semillas y sugieren que *C. alternans* no ha sufrido efectos importantes por deriva génica o por endogamia. Los bajos niveles de diferenciación genética entre subpoblaciones ($G_{st}=0.018$), categorías de edad ($G_{st}=0.028$) y tamaño ($G_{st}=0.013$) confirman la existencia de un elevado flujo génico. La migración estimada fue de 13.7 individuos por generación entre subpoblaciones. El único coeficiente de diferenciación (G_{st}) significativamente distinto de cero fue el estimado entre plántulas y adultos. El 26% de los loci presentaron diferencias significativas en las frecuencias alélicas para plántulas y adultos. Lo cual se puede ser un efecto de la dispersión de semillas y de la reproducción diferencial de los individuos.

Introducción

La estructura genética de una población determina el potencial evolutivo de una especie y es afectada tanto por factores demográficos como genéticos. Los factores demográficos incluyen todos los procesos que determinan la historia de vida de una especie y los factores genéticos incluyen procesos como la mutación, recombinación, deriva génica y selección (Nei, 1987; Hartl y Clark, 1989)

La variación genética de una población está formada por la suma de la variación entre los individuos dentro de una población y se mide con parámetros como el polimorfismo (P) y la diversidad genética o heterocigosidad promedio (H). Un locus se considera polimórfico si su alelo más común presenta una frecuencia mayor de 0.95 (Hartl y Clark, 1989). La diversidad genética, H es el porcentaje de heterócigos por locus esperados de la población, es decir, la proporción esperada de loci heterócigos en un individuo escogido al azar. Para medir la distribución de la variación genética, la diversidad genética total de la población (H_t) puede descomponerse en la diversidad genética dentro (H_s) y entre (D_{st}) subpoblaciones. La magnitud relativa de la diferenciación genética entre subpoblaciones puede ser medida mediante el coeficiente de variación genética, $G_{st} = D_{st}/H_t$, que varía de 0 a 1 (Nei, 1987).

Utilizando estos parámetros se han determinado los niveles de variación y la estructura genética en diferentes especies mediante la variación en la electroforesis de proteínas (Harris, 1966; Lewontin y Hubby, 1966). Revisiones recientes de un gran número de este tipo de estudios han revelado que I) la mayor parte de los estudios de genética de poblaciones se han llevado a cabo con especies de comunidades de climas templados, principalmente anuales, perennes de vida corta o coníferas; II) son escasos los trabajos de este tipo con herbáceas de vida larga, especies de árboles del grupo de las angiospermas o de monocotiledóneas y III) la variación genética en las poblaciones vegetales no se

distribuye al azar y que los niveles y estructura de esta variación son afectados por el sistema de apareamiento, flujo génico, dispersión y selección (Howe *et al.*, 1985; Hamrick y Loveless, 1986; Hamrick, 1990; Hamrick *et al.*, 1992; Loveless, 1992).

Uno de los factores más importantes que moldea la estructura genética de las poblaciones es el flujo génico; niveles elevados de flujo génico aumentan el tamaño efectivo de las poblaciones y reducen la diferenciación local por deriva génica o selección natural; en tanto que si el flujo génico es limitado se reduce el tamaño efectivo de las poblaciones y aumenta la diferenciación entre subpoblaciones (Fleming y Heintaus, 1981; Levin, 1988; Howe, 1989; 1990; Slatkin, 1993). El flujo génico está dado por la dispersión de polen y de semillas (Levin, 1981).

Una baja dispersión de polen puede resultar en elevadas tasas de autofecundación o fecundación entre individuos cercanos. La mayoría de los árboles tropicales presentan altos niveles de fecundación cruzada y el dioicismo es relativamente común (Bawa y Opler, 1975; Bawa, 1980; Bullock, 1985). El estudio de la estructura genética poblacional y de los sistemas de apareamiento de los árboles tropicales ha mostrado que, con pocas excepciones (ver Murawski *et al.*, 1990; Murawski y Hamrick, 1991; Murawski *et al.*, 1994), la tasa de entrecruzamiento estimada con datos de enzimas es mayor de 0.80 (*e.g.* O'Malley y Bawa, 1987; O'Malley *et al.*, 1988; Eguiarte *et al.*, 1992; Boshier *et al.*, 1995). Fritsch y Rieseberg (1992) reportan elevados niveles de entrecruzamiento (0.65-0.92) en dos poblaciones de *Datisca glomerata*, una especie androdioica. Este es el único trabajo en el que se han utilizado estimado tasas de entrecruzamiento con datos de RAPDs.

Mientras que en la dispersión del polen se trata del movimiento de un genoma haploide, la dispersión de semillas involucra el movimiento de genes de ambos progenitores, por ello la contribución del polen al flujo génico es la mitad que la de la

dispersión de semillas (Crawford, 1984). Con base en la unidad de dispersión las semillas debieran contribuir de una manera más efectiva que el polen a la diferenciación entre poblaciones. Sin embargo, el efecto de la distancia del movimiento de semillas sobre la estructura genética, no es simplemente una función del nivel de dispersión. En contraste con el flujo de polen que migra entre poblaciones establecidas, el flujo de semillas puede resultar en migración entre poblaciones establecidas o colonización de nuevos ambientes (Silvertown y Lovett Doust, 1993).

Estas diferencias entre el flujo de polen de semillas y el de polen pueden explicar en parte por qué el mecanismo de polinización predice de manera más adecuada la distribución de la variación genética dentro y entre poblaciones que los síndromes de dispersión de semillas (Hamrick y Godt, 1989). Aunque cuando se consideran categorías más generales para el tipo de dispersión, se encuentra una mayor relación con la estructura genética. Las especies tropicales con dispersión biótica presentan una diferenciación genética significativamente menor entre subpoblaciones separadas por kilómetros que las especies con dispersión abiótica (Loveless, 1992). Hamrick *et al.*, (1993) estudiando tres especies tropicales con diferentes densidades poblacionales y mecanismos de dispersión de semillas, encontraron que las especies con semillas dispersadas por viento y con baja densidad poblacional presentan una mayor estructura genética en sus plántulas que las especies con semillas dispersadas por animales o con densidades mayores.

El flujo génico vía polen y semillas, así como la distribución espacial de los individuos dentro de una población tienen importantes efectos sobre la estructura genética. McCauley (1994) al comparar dos métodos moleculares encontró que tanto la dispersión de semillas como de polen contribuyen significativamente al flujo génico en *Silene alba*. En particular las comunidades de selva tropical presentan una gran diversidad de especies, de las cuales algunas presentan una gran abundancia y densidad mientras que otras son poco abundantes (Hubbell y Foster, 1983; Bongers *et al.*, 1988). Los individuos

reproductivos de especies poco abundantes pueden estar muy separados entre sí, lo cual podría resultar en autofecundación (Murawski *et al.*, 1990; Murawski y Hamrick, 1991) o bien, promover el flujo de polen a largas distancias (Boshier *et al.*, 1995). En las especies con elevadas densidades poblacionales podría ser mayor la probabilidad de apareamientos entre individuos cercanos y posiblemente emparentados (Hamrick y Loveless, 1986; Bawa y Ashton, 1991; Loveless, 1992).

Los datos de 97 estudios acerca de la genética de especies tropicales leñosas mediante enzimas (Loveless, 1992) han mostrado que los niveles de diversidad genética son elevados para los árboles tropicales y que gran parte de esta diversidad se presenta a nivel intrapoblacional (Hamrick y Godt, 1989; Hamrick, 1990; Loveless, 1992). Esto se explica por las elevadas tasas de fecundación cruzada en árboles tropicales debido a sistemas como el dioicismo, protandria, heterostilia e incompatibilidad genética (Bawa, 1974; Bawa y Opler, 1975; Baker *et al.*, 1983; Bawa *et al.*, 1985).

Aún cuando el conocimiento actual sobre la ecología, genética y evolución de las especies de selva es fragmentario, el uso de las técnicas de la electroforesis de enzimas y de los marcadores moleculares, así como el estudio de la polinización, biología reproductiva y sistemas de apareamiento incrementarán nuestro entendimiento sobre la biología de estas especies (Bawa, 1990, Bawa y Krugman, 1991).

Como se mencionó anteriormente, la estructura genética de las poblaciones ha sido determinada comúnmente mediante la variación enzimática, aún cuando el polimorfismo que revelan es limitado. Esta técnica se basa en las diferencias de carga eléctrica y peso molecular entre variantes de enzimas específicas, las cuales pueden ser diferenciadas por medio de una electroforesis (Schaal *et al.*, 1991).

Existen varias formas de detectar un mayor polimorfismo genético directamente de la molécula de ADN. Los marcadores moleculares basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, "Polimerasa chain reaction"; Saiki *et al.*, 1985; Scharf *et al.*, 1986) incluyendo el polimorfismo en longitud de endonucleasas de restricción (RFLP-PCR, "Restriction fragment length polymorphisms based on PCR"), microsátélites o repeticiones de secuencias simples (SSR, Simple Sequence Repeats, Morgante y Oliveri, 1993), minisatélites (DNA fingerprinting, Jeffreys *et al.*, 1985) y RAPDs ("Random Amplified Polymorphic DNAs", Welsh y McClelland, 1990; Williams *et al.*, 1990; Caetano-Anollés *et al.*, 1991) son una variedad de técnicas apropiadas para estudios de genética de poblaciones en plantas (Bachmann, 1994). En particular los RAPDs, aun cuando se trata de marcadores dominantes, han sido más utilizados a nivel infraespecífico debido a que es una técnica sencilla y el número de oligonucleótidos disponibles es ilimitado, muestrean aleatoriamente el genoma y no requieren de un conocimiento previo de la secuencia de ADN. Esta técnica se basa en la probabilidad estadística de que se presenten sitios complementarios a un oligonucleótido diseñado aleatoriamente a lo largo del genoma. Los polimorfismos (diferencias en el número de bandas) entre los individuos generados por los RAPDs se deben a cambios en la secuencia de los nucleótidos en los sitios de acoplamiento y por inserción o delección de los fragmentos en estos sitios (Williams *et al.*, 1990).

Los resultados de los estudios que utilizan los RAPDs para describir la variación y estructura genética de las poblaciones (*e.g.* Mosseler *et al.*, 1992; Gustafsson y Gustafsson, 1994; Peakall *et al.*, 1995; Roelofs y Bachmann, 1995; Steward y Excoffier, 1996; Paran *et al.*, 1997) han encontrado niveles mayores de variación y han permitido estudiar la estructura genética en especies en las cuales se había detectado poca o nula variación con enzimas (Brauner *et al.*, 1992; Rossetto *et al.*, 1995; Friar *et al.*, 1996; Tuskan *et al.*, 1996).

En este trabajo se estudian los niveles de variación y la estructura genética, así como su relación con parámetros demográficos como categorías de edad, tamaño, sexo y producción de inflorescencias de una población de *C. alternans* en la selva tropical de Los Tuxtlas mediante el uso de los marcadores moleculares RAPDs.

Objetivos:

1. Describir la variación y estructura genética de una población de *Chamaedorea alternans* en la selva de "Los Tuxtlas" por medio de los marcadores moleculares RAPDs.
2. Estimar si existen diferencias en la variación genética entre las diferentes categorías de tamaño, edad y sexo.
3. Determinar la relación entre la variación genética y la producción de estructuras reproductivas durante el periodo reproductivo de 1995-1996.

Sitio y sistema de estudio

La colecta de material se llevó a cabo en un sitio permanente de 600m² dentro de la Estación de Biología Tropical "Los Tuxtlas" (Fig. 1), cuyas características se describieron en el capítulo anterior. En este mismo sitio, previamente se llevaron a cabo estudios demográficos y ecológicos de la especie *Ch. alternans* (cf. *Ch. tepejilote*; Oyama, 1984; 1987; 1990; 1991; 1993; Oyama y Mendoza, 1990; Oyama y Dirzo, 1991); por lo que se tienen individuos marcados desde hace diez años. Una descripción de la historia natural de la especie se presenta en la introducción general.

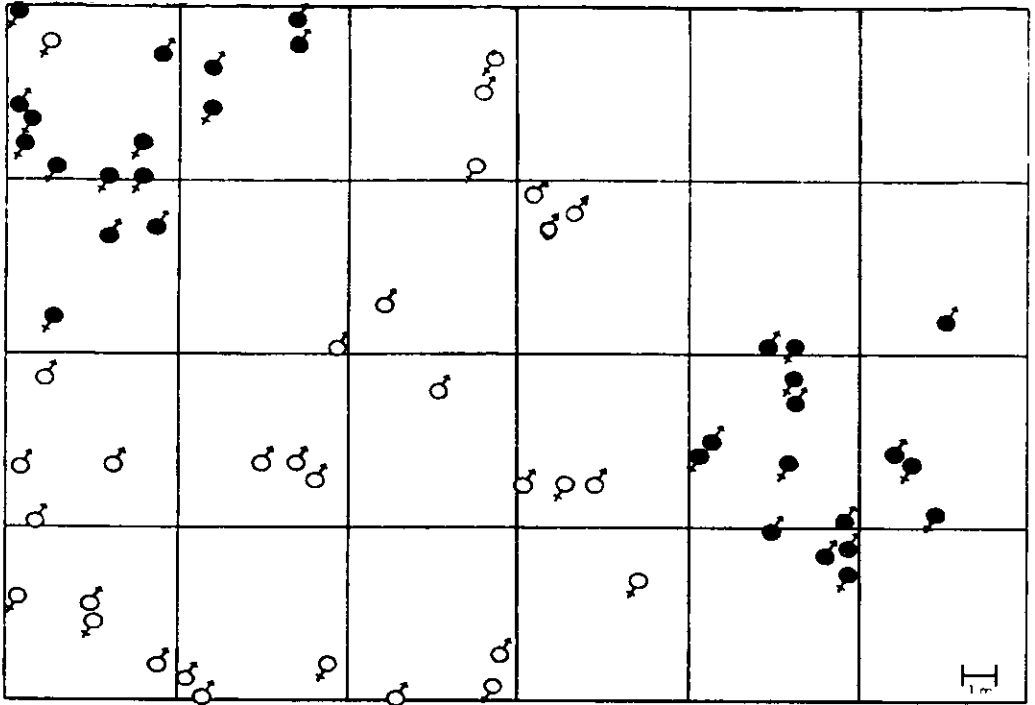


Figura 1. Ubicación de los individuos reproductivos de *Ch. alternans* dentro de 600 m² en la selva de Los Tuxtlas, Veracruz. Los círculos rellenos representan a los individuos de dos subpoblaciones.

Métodos

Trabajo de campo

Se ubicó y se midió la longitud del tallo de todos los individuos que se reprodujeron durante 1995 de la población dentro de un área de 600 m² y se registró su sexo correspondiente (en 1995 se registraron 62 individuos en total 25 femeninos y 37 masculinos). Se colectaron hojas de cada uno de estos individuos, se lavaron y se

congelaron en nitrógeno líquido para su transporte y se almacenaron a -80°C hasta la extracción de ADN. Durante la época de fructificación se colectaron semillas de cada individuo femenino, germinaron y se dejó crecer a las plántulas en una cámara de crecimiento hasta tener un tamaño adecuado para la extracción de ADN.

Trabajo de laboratorio.

Extracción de ADN. Se llevó a cabo siguiendo el protocolo recomendado para árboles tropicales (de la Cruz *et al.*, 1995). Los extractos de ADN se analizaron en geles de agarosa al 0.8% y se cuantificó utilizando un mini-fluorómetro DyNA Quant 200 (Hoefler Scientific Instruments).

Amplificación de ADN. Se probaron 20 decámeros de la serie F de Operon Technologies Inc. (Alameda Calif, USA) como oligonucleótidos para la amplificación. Con 11 de estos oligonucleótidos se obtuvieron amplificaciones. Se utilizaron oligonucleótidos con un contenido de guanina (G) o citosina (C) no mayor del 60%, éstos se eligieron tomando en cuenta la cantidad y claridad de las bandas amplificadas y la replicabilidad (ver Clark y Lanigan, 1993). El volumen total de la reacción fue de 25 μl conteniendo 10 ng de ADN genómico, 1 x buffer (Promega; 50mM KCl, 10 mM Tris HCl, pH9. 0.1% Triton x-100=, 2 mM $\text{Mg}(\text{Cl}_2)$, 0.1 mM de cada nucleótido dATP, dCTP, dGTP y dTTP, 0.2 μM del primer y 1.5 U de Taq DNA polimerasa (Promega). Cada reacción se llevó a cabo con aceite mineral estéril para evitar la evaporación durante la reacción (ver Fig 2).

**ESTA TESTS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

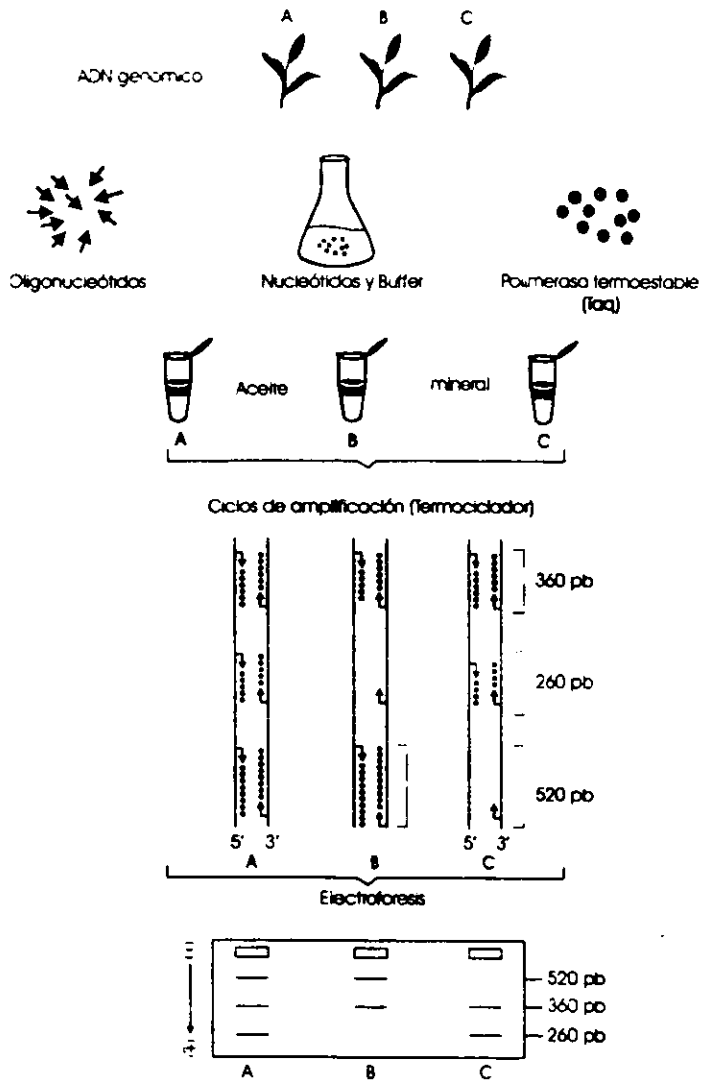
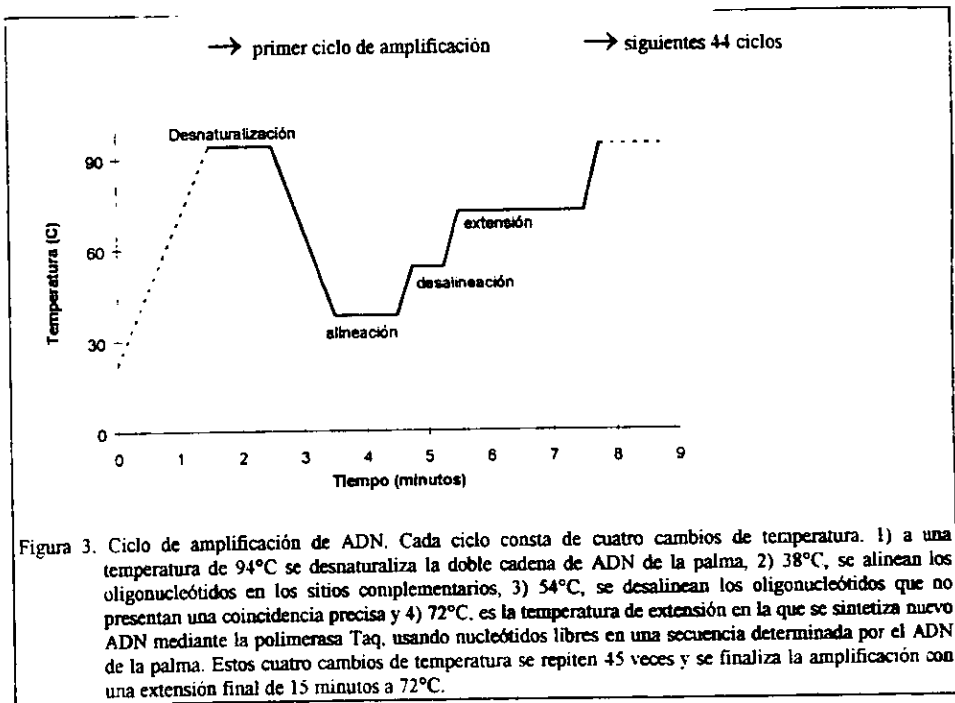


Figura 2. Esquema de la amplificación de ADN mediante la técnica de RAPDs. Se mezclan cantidades exactas de ADN genómico del organismo de interés (A, B o C), un oligonucleótido, nucleótidos, buffer conteniendo iones de Mg^{2+} y polimerasa termoestable (Taq) añadiendo finalmente aceite mineral en un tubo de reacción, el cual es sujeto a ciclos de temperatura. Los oligonucleótidos se alinean en los sitios del ADN genómico complementarios a su secuencia. Si se alinean dos oligonucleótidos en direcciones opuestas y a una distancia adecuada el uno del otro el fragmento es amplificado. Los productos amplificados son separados mediante una electroforesis en gel (Figura modificada de Weising et al., 1995).

Las amplificaciones se llevaron a cabo en un termociclador modelo PTC-100 (MJ Research) programado a 45 ciclos de 1min a 94°C (desnaturalización), 1min a 38°C (alineación), 30s a 54°C (para evitar alineaciones erróneas), 2min a 72°C (extensión) con una extensión final de 15 min a 72°C (Fig. 3). Los productos de la amplificación fueron separados en geles de agarosa al 1.4% corridos a 120V en 0.5x TBE por 4 h. Los geles se tiñieron con bromuro de etidio, se visualizaron y fotografiaron con luz UV.



Análisis. Los fragmentos de cada locus fueron tomados como presente (1) o ausente (0) para cada uno de los individuos. Cada banda fue considerada como un locus independiente, denominado según el nombre del oligonucleótido y el tamaño del fragmento amplificado (p ej. 9,1 para la banda más pequeña amplificada por el oligonucleótido F9).

Si cada banda representa un caracter estadísticamente independiente, la probabilidad de que n bandas puedan encontrarse en dos individuos tomados al azar, asumiendo un nivel de similitud en el patrón de bandeo de S entre los individuos de la población, es: $P=S^n$, donde P es la probabilidad de encontrar dos individuos con el mismo patrón de bandeo, S es la similitud promedio encontrada entre los individuos de la población, calculada mediante el coeficiente de similitud de Jacard y n es el número promedio de bandas por planta (ver Nybom y Hall, 1991). Esta probabilidad fue calculada para cada uno de los oligonucleótidos utilizados.

Se llevó a cabo una prueba estadística de la desviación de los adultos reproductivos del equilibrio de Hardy-Weinberg mediante la prueba de χ^2 evaluando las frecuencias observadas en adultos, z_a y $1-z_a$ (donde z es la proporción de individuos en los que no se observó la banda), contra las esperadas en la descendencia, z_h y $1-z_h$. En los loci donde no hay evidencia significativa de que

$F_{IS}=0$, es razonable estimar las frecuencias alélicas para ambas generaciones (Lynch y Milligan, 1994).

Para asegurar el muestreo de un sólo locus se llevó a cabo una correlación pareada de Spearman entre las bandas obtenidas. Las bandas para las cuales la correlación fue perfecta (1 ó -1) fueron eliminadas (Whitkus *et al.* 1998). Para eliminar sesgo en las estimaciones de los parámetros de diversidad genética se eliminaron los loci cuya frecuencia de homócigos recesivos fuera mayor de $3/N$, donde N es el número de individuos de la población (Lynch y Milligan, 1994).

La población fue subdividida en diferentes categorías. Para ver si existe una estructura espacial de la población se consideraron dos parches de 16 individuos en 100 m^2 cada uno, separados entre sí por 10m de distancia (Fig. 1). El resto de las categorías de subdivisión de la población se presentan en el cuadro 1. Los individuos masculinos produjeron significativamente más inflorescencias que los femeninos durante el período reproductivo de 1995-1996 (ver Cuadro 4, capítulo anterior). Por ello, en este caso la subdivisión de la población se hizo de manera diferencial entre sexos.

Cuadro 1. Categorías de subdivisión de la población en función de la altura (longitud del tallo), edad, producción de inflorescencias durante el período reproductivo de 1995-1996 y sexo de la población de *Ch. alternans* en la selva de Los Tuxtlas.

Categoría	Subdivisiones (n)	
Altura	I. $\leq 1\text{m}$ (25)	II. $> 1\text{m}$ (27)
Edad	Adultos (52)	Plántulas (86)
Producción de inflorescencias	Baja (27)	Alta (25)
Individuos femeninos	≤ 2 (10)	> 2 (7)
Individuos masculinos	≤ 8 (17)	> 8 (18)
Sexo	Femenino (17)	Masculino (35)

Para cada caso y cada componente de la población se estimaron las frecuencias alélicas totales considerando que la población se encuentra en equilibrio de Hardy-Weinberg. Se determinó z como la frecuencia de genotipos en los que una banda particular no amplificó. Entonces, la frecuencia del alelo nulo en la población se estimó como $q = z^{1/2}$. El sesgo de este estimador puede ser substancial cuando el alelo nulo es raro, para disminuir este sesgo se siguieron las restricciones sugeridas por Lynch y Milligan (1994); aún cuando en las simulaciones descritas por Clark y Lanigan (1993) el error en las estimaciones fue negligible. Con las frecuencias alélicas basadas en estas restricciones se estimaron el índice de diversidad de Shannon (I) y la heterosis esperada (Nei, 1973). Además se llevó a cabo el análisis de diversidad genética para poblaciones subdivididas (Nei, 1987). Todos los parámetros poblacionales fueron calculados por medio del programa POPGENE (Yeh *et al.*, 1997) para datos dominantes y diploides.

El índice de diversidad de Shannon se calculó mediante la fórmula :

$$I = -\sum(p_i \log_2 p_i),$$

donde p_i es la frecuencia del alelo i_{th} de un locus. Este estadístico siempre tiene valores mayores de cero, conforme mayor es el valor indica una mayor diversidad. Esta medida es aditiva y ha sido utilizada para calcular la diversidad dentro y entre poblaciones (Chalmers *et al.*, 1992; Russell *et al.* 1993).

La diversidad genética total (H_T) fue calculada promediando la heterocigosis ($H=2pq$) de cada locus para la población total. Así mismo se determinó la heterosis promedio de cada subpoblación y la diversidad genética dentro de cada subpoblación (H_S) fue calculada promediando la heterocigosis de las subpoblaciones (Nei, 1987). La proporción de la variación genética total encontrada entre subpoblaciones (G_{st}) fue calculada para cada locus ($G_{st}=(H_T-H_S)/H_T$). La significancia estadística de los valores de G_{st} fue examinada mediante una prueba de $\chi^2 = 2nG_{st}(a-1)$ con $g.l.=(a-1)(n-1)$, donde N es el número total de individuos, a es el número de alelos por locus y n es el número de subdivisiones de la población (Workman y Niswander, 1970). El flujo génico entre las subpoblaciones, Nm fue estimado indirectamente mediante el valor de G_{st} (Slatkin y Barton, 1989), donde:

$$Nm = (1-G_{st})/4G_{st}$$

Para determinar si existen diferencias en las frecuencias alélicas entre cada subdivisión de la población, se llevó a cabo una prueba de heterogeneidad mediante la prueba de χ^2 . Considerando como los valores observados el número de alelos calculado mediante las frecuencias alélicas de cada subdivisión de la población y los esperados

con las frecuencias alélicas de la población sin subdivisión. debido al gran número de comparaciones se considero una significancia conservadora de $P > 0.02$

Resultados

El número de fragmentos de ADN amplificados por cada primer varía de 8 a 13 (Cuadro 2) El tamaño de los fragmentos va de 452 a 2028 pb. Se amplificaron un total de 53 fragmentos producidos por los 5 oligonucleótidos, de los cuales el 75% fueron polimórficos en los individuos adultos, aumentando el polimorfismo a 89% cuando se incluyeron los datos de las plántulas.

Cuadro 2. Resumen de los datos obtenidos con los marcadores moleculares RAPDs con 5 oligonucleótidos para n=138 plantas de *Chamaedorea alternans* (52 adultos y 86 plántulas) Se muestran la secuencia de nucleótidos, el número de bandas obtenidas, el número de bandas promedio así como el intervalo por genotipo y el tamaño de las bandas amplificadas por cada oligonucleótido. La probabilidad de encontrar a 2 individuos con el mismo patrón de bandeo (P. ver texto) para cada primer fue calculada para los individuos reproductivos.

Secuencia del primer 5' a 3'	Número de bandas (polimórficas adultos, bandas/planta población total) (intervalo)	No. promedio de bandas/planta (intervalo)	Tamaño (pares de bases)	P
F9 CCAAGCTTCC	13 (9, 11)	8.9 (6-11)	452-1845	0.33
F13 GGCTGCAGAA	11 (8, 11)	9.0 (7-11)	492-2028	0.53
F14 TGCTGCAGGT	13 (11, 12)	8.7 (6-12)	522-1660	0.19
F15 CCAGTACTCC	8 (6, 7)	6.1 (3-8)	676-1722	0.54
F16 GGAGTACTGG	8 (6, 6)	4.7 (3-7)	675-1170	0.58
total	53 (40-47)	37.33 (32-43)	452-2028	1.5x10⁻¹¹

Con el oligonucleótido F14 la probabilidad de encontrar 2 individuos con el mismo patrón de bandeo fue de 0.19 (cuadro 2). Con los datos generados por 2 (F9 y

F14) y 3 oligonucleótidos (F9, F13 y F14) esta probabilidad disminuye a 1.6×10^{-2} y 3.14×10^{-3} , respectivamente. Para cada individuo adulto se obtuvo un patrón único con los 5 oligonucleótidos utilizados ($P = 1.5 \times 10^{-11}$).

Para ninguno de los loci polimórficos se encontró una desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg mediante la prueba de χ^2 . El análisis de correlación por rangos de Spearman, así como la restricción en el número de bandas a aquellas cuya frecuencia del alelo nulo fuera mayor a $3/N$ (Lynch y Milligan, 1994) redujo el número de loci en todos los casos (Cuadro 3). De esta forma se reduce la posibilidad de duplicar el muestreo del mismo locus y se disminuye el sesgo en los estimadores.

Variación genética de la población

La diversidad genética de la población total, considerando plántulas e individuos reproductivos fue de $H=0.349 \pm 0.127$, $I=0.52 \pm 0.15$ (34 loci); de los individuos reproductivos fue de $H=0.356 \pm 0.13$; $I=0.53 \pm 0.16$ (31 loci) y para las plántulas fue de $H=0.34 \pm 0.13$; $I=0.51 \pm 0.16$ (33 loci). En el cuadro 3 se presentan los estimadores genéticos obtenidos para las subpoblaciones y categorías de subdivisión de la población obtenidos a partir de las frecuencias alélicas.

Cuadro 3 Variación genética promedio y desviación estandar (D.S.) de una población de *Ch. alferrians* en la selva de Los Tuxtlas. Datos de dos subpoblaciones separadas por 10m de distancia, de adultos reproductivos y plántulas, de categorías de altura, producción de inflorescencias y sexo. Se presenta el tamaño de la muestra, N; el número de loci, el índice de diversidad de Shannon, I, la diversidad genética, H y el análisis combinado para cada subdivisión de la población de la diversidad genética de Nei (1987)

		N	n	I	H	H _T	H _s	G _{st}
Subpoblación A	Media	16	28	0.53	0.357			
	D.S.			0.18	0.15			
Subpoblación B	Media	16	28	0.48	0.316			
	D.S.			0.20	0.159			
Total	Media	32	28	0.51	0.343	0.343	0.337	0.018
	D.S.			0.18	0.149	0.022	0.021	
Plántulas	Media	86	34	0.50	0.330			
	D.S.			0.18	0.144			
Adultos reproductivos	Media	52	34	0.52	0.348			
	D.S.			0.16	0.13			
Total	Media	138	34	0.52	0.349	0.349	0.339	0.028*
	D.S.			0.15	0.126	0.016	0.014	
Altura I	Media	25	31	0.52	0.349			
	D.S.			0.18	0.134			
Altura II	Media	27	31	0.53	0.355			
	D.S.			0.17	0.141			
Total	Media	52	31	0.53	0.357	0.357	0.352	0.013
	D.S.			0.16	0.133	0.018	0.017	
Producción baja	Media	27	31	0.53	0.359			
	D.S.			0.15	0.127			
Producción alta	Media	25	31	0.50	0.336			
	D.S.			0.18	0.143			
Total	Media	52	31	0.53	0.356	0.356	0.347	0.023
	D.S.			0.16	0.133	0.018	0.017	
Masculinos	Media	35	31	0.53	0.352			
	D.S.			0.15	0.128			
Femeninos	Media	17	31	0.51	0.344			
	D.S.			0.18	0.143			
Total	Media	52	31	0.53	0.356	0.356	0.348	0.023
	D.S.			0.16	0.133	0.018	0.017	

*significativamente diferente de 0

Estructura de la población

De manera general en todos los casos la mayoría de la variación genética se presenta entre los individuos, con valores de H_s muy cercanos a H_T y un coeficiente de diferenciación (G_{st}) entre las subpoblaciones no mayor a 0.3. El valor más alto de G_{st}

se presentó entre plántulas y adultos reproductivos (2.8%), y es el único que fue significativo ($\chi^2=7.73$, 1g.l, $P>0.01$).

En el caso de la estructura espacial de la población se estimó una migración (Nm) de 13.75 por generación entre las subpoblaciones. Ninguno de los loci presentó diferencias significativas en las frecuencias alélicas entre las subpoblaciones al aplicar la prueba de χ^2 (Cuadro 4). Por otro lado, al comparar las frecuencias alélicas entre plántulas y adultos reproductivos, el 26% (9) de los loci presentan diferencias significativas. La heterocigosis es mayor en adultos que en plántulas lo que indica que no hubo inmigración de alelos nuevos vía polen (Cuadro 5).

Con respecto a las categorías de producción de inflorescencias sólo para el locus 13.9 se presentan diferencias significativas en las frecuencias alélicas. En este locus el alelo nulo presentó una frecuencia menor en la categoría de producción baja de inflorescencias y mayor en la categoría de producción alta (Cuadro 6). Al comparar las frecuencias alélicas entre sexos, también fue un sólo locus el que presentó diferencias significativas. Para el locus 14,8 la frecuencia del alelo nulo fue menor en los individuos femeninos y mayor en los masculinos (Cuadro 7).

Cuadro 4. Frecuencias alélicas para dos subpoblaciones de *Chamaedorea alternans* y la prueba de χ^2 para la heterogeneidad en frecuencias alélicas entre las subpoblaciones para 28 loci polimórficos. La población total fue de 600m² y cada subpoblación fue de 100m².

Locus	Población A (16)		Población B (16)		χ^2	P
	Alelo 0	Alelo 1	Alelo 0	Alelo 1		
9,2	0.3536	0.6464	0.3536	0.6464	0.00	1.00
9,3	0.866	0.134	0.7071	0.2929	1.20	0.27
9,5	0.6124	0.3876	0.6614	0.3386	0.08	0.77
9,6	0.866	0.134	0.7906	0.2094	0.32	0.57
9,9	0.433	0.567	0.433	0.567	0.00	1.00
9,11	0.9354	0.0646	0.9682	0.0318	0.18	0.66
9,12	0.866	0.134	0.9014	0.0986	0.09	0.75
13,6	0.6124	0.3876	0.7906	0.2094	1.21	0.27
13,9	0.5	0.5	0.7071	0.2929	1.43	0.23
13,10	0.6614	0.3386	0.866	0.134	1.85	0.17
14,1	0.433	0.567	0.25	0.75	1.19	0.27
14,2	0.8292	0.1708	0.7906	0.2094	0.07	0.78
14,3	0.5	0.5	0.25	0.75	2.13	0.14
14,4	0.7906	0.2094	0.8292	0.1708	0.07	0.78
14,5	0.6614	0.3386	0.6614	0.3386	0.00	1.00
14,6	1	0	0.9354	0.0646	1.06	0.30
14,7	0.559	0.441	0.5	0.5	0.11	0.73
14,8	0.5	0.5	0.433	0.567	0.14	0.70
14,11	0.866	0.134	0.9014	0.0986	0.09	0.75
15,2	0.9014	0.0986	0.9354	0.0646	0.12	0.72
15,4	0.8292	0.1708	0.9682	0.0318	1.70	0.19
15,5	0.3536	0.6464	0.433	0.567	0.21	0.64
15,8	0.433	0.567	0.433	0.567	0.00	1.00
16,4	0.9354	0.0646	0.9682	0.0318	0.18	0.66
16,5	0.6614	0.3386	0.8292	0.1708	1.18	0.27
16,6	0.7071	0.2929	0.7071	0.2929	0.00	1.00
16,7	0.5	0.5	0.6124	0.3876	0.40	0.52
16,8	0.9014	0.0986	1	0	1.65	0.19

Cuadro 5. Prueba de χ^2 para la heterogeneidad de las frecuencias alélicas entre plántulas y adultos de *Chamaedorea alternans* para 34 loci polimórficos.

Locus	Adultos (54)		Plántulas (86)		χ^2	P
	Alelo 0	Alelo 1	Alelo 0	Alelo 1		
9,2	0.3922	0.6078	0	1	39.58	0.001*
9,3	0.8321	0.1679	0.9705	0.0295	8.28	0.004*
9,5	0.6651	0.3349	0.5807	0.4193	0.97	0.324
9,6	0.7845	0.2155	0.7625	0.2375	0.08	0.766
9,7	0.1961	0.8039	0.5603	0.4397	17.6	0.001*
9,9	0.4804	0.5196	0.6647	0.3353	4.57	0.032
9,10	0.1387	0.8613	0.2853	0.7147	3.93	0.047
9,11	0.8987	0.1013	0.9524	0.0476	1.47	0.224
9,12	0.866	0.134	0.8283	0.1717	0.34	0.555
13,2	0.2402	0.7598	0.2853	0.7147	0.33	0.562
13,6	0.6934	0.3066	0.7548	0.2452	0.62	0.429
13,7	0.2402	0.7598	0.2853	0.7147	0.33	0.562
13,8	0.1387	0.8613	0.3235	0.6765	5.84	0.015*
13,9	0.5883	0.4117	0.8283	0.1717	9.64	0.001*
13,10	0.7596	0.2404	0.7924	0.2076	0.20	0.651
14,1	0.3397	0.6603	0.3888	0.6112	0.33	0.562
14,2	0.7966	0.2034	0.8141	0.1859	0.06	0.800
14,3	0.416	0.584	0.3735	0.6265	0.24	0.619
14,4	0.7721	0.2279	0.8826	0.1174	2.96	0.085
14,5	0.6651	0.3349	0.341	0.659	13.6	0.001*
14,6	0.9707	0.0293	0.9584	0.0416	0.13	0.710
14,7	0.5718	0.4282	0.4313	0.5687	2.55	0.109
14,8	0.5189	0.4811	0.8422	0.1578	16.8	0.001*
14,11	0.7966	0.2034	0.8069	0.1931	0.02	0.882
15,2	0.8987	0.1013	0.6988	0.3012	7.40	0.006*
15,4	0.8987	0.1013	0.876	0.124	0.16	0.686
15,5	0.4599	0.5401	0.3735	0.6265	1.00	0.316
15,7	0.3397	0.6603	0.6195	0.3805	10.1	0.001*
15,8	0.3669	0.6331	0.2157	0.7843	3.73	0.053
16,4	0.9507	0.0493	0.9645	0.0355	0.15	0.691
16,5	0.8204	0.1796	0.8069	0.1931	0.03	0.844
16,6	0.7468	0.2532	0.7701	0.2299	0.09	0.755
16,7	0.5371	0.4629	0.5807	0.4193	0.25	0.616
16,8	0.9405	0.0595	0.9022	0.0978	0.62	0.429

*P<0.02

Cuadro 6. Prueba de χ^2 para la heterogeneidad de las frecuencias alélicas entre las categorías de tamaño de *Chamaedorea alternans* para cada uno de los 31 loci polimórficos.

Locus	Altura I		Altura II		χ^2	P
	Alelo 0	Alelo 1	Alelo 0	Alelo 1		
9,2	0.4	0.6	0.385	0.615	0.01	0.91
9,3	0.825	0.175	0.839	0.161	0.01	0.89
9,5	0.693	0.307	0.638	0.362	0.17	0.67
9,6	0.721	0.279	0.839	0.161	1.05	0.30
9,9	0.346	0.654	0.577	0.423	2.78	0.09
9,11	0.872	0.128	0.923	0.077	0.37	0.54
9,12	0.894	0.106	0.839	0.161	0.34	0.55
13,2	0.2	0.8	0.272	0.728	0.37	0.54
13,6	0.748	0.252	0.638	0.362	0.73	0.39
13,7	0.2	0.8	0.272	0.728	0.37	0.54
13,9	0.49	0.51	0.667	0.333	1.66	0.19
13,10	0.721	0.279	0.794	0.207	0.37	0.54
14,1	0.346	0.654	0.333	0.667	0.01	0.92
14,2	0.721	0.279	0.861	0.139	1.54	0.21
14,3	0.4	0.6	0.43	0.57	0.04	0.82
14,4	0.775	0.225	0.77	0.23	0.01	0.96
14,5	0.663	0.337	0.667	0.333	0.01	0.97
14,6	0.98	0.02	0.962	0.038	0.14	0.70
14,7	0.6	0.4	0.544	0.456	0.16	0.68
14,8	0.566	0.434	0.471	0.529	0.46	0.49
14,11	0.872	0.128	0.72	0.28	1.81	0.17
15,2	0.894	0.106	0.903	0.097	0.01	0.92
15,4	0.894	0.106	0.903	0.097	0.01	0.92
15,5	0.49	0.51	0.43	0.57	0.18	0.66
15,7	0.346	0.654	0.333	0.667	0.01	0.92
15,8	0.346	0.654	0.385	0.615	0.08	0.77
16,4	0.938	0.062	0.962	0.038	0.16	0.68
16,5	0.775	0.225	0.861	0.139	0.64	0.42
16,6	0.872	0.128	0.609	0.391	4.61	0.03
16,7	0.529	0.471	0.544	0.456	0.01	0.91
16,8	0.938	0.062	0.943	0.057	0.01	0.94

*P<0.02

Cuadro 7. Prueba de χ^2 para la heterogeneidad de las frecuencias alélicas entre las categorías de producción de inflorescencias durante el período de 1995-1996 de *Chamaedorea alternans* para 31 loci polimórficos.

Locus	Producción baja (27)		Producción alta (25)		χ^2	P
	Alelo 0	Alelo 1	Alelo 0	Alelo 1		
9,2	0.3333	0.6667	0.4472	0.5528	0.70	0.39
9,3	0.7454	0.2546	0.9165	0.0835	2.66	0.10
9,5	0.6667	0.3333	0.6633	0.3367	0.001	0.97
9,6	0.8165	0.1835	0.7483	0.2517	0.35	0.55
9,9	0.4303	0.5697	0.5292	0.4708	0.50	0.47
9,11	0.8819	0.1181	0.9165	0.0835	0.17	0.67
9,12	0.7935	0.2065	0.9381	0.0619	2.29	0.12
13,2	0.1925	0.8075	0.2828	0.7172	0.58	0.44
13,6	0.6667	0.3333	0.7211	0.2789	0.18	0.67
13,7	0.1925	0.8075	0.2828	0.7172	0.58	0.44
13,9	0.3333	0.6667	0.7746	0.2254	10.1	0.001*
13,10	0.7698	0.2302	0.7483	0.2517	0.03	0.85
14,1	0.4303	0.5697	0.2	0.8	3.10	0.07
14,2	0.7454	0.2546	0.8485	0.1515	0.84	0.35
14,3	0.5092	0.4908	0.2828	0.7172	2.76	0.09
14,4	0.7698	0.2302	0.7746	0.2254	0.001	0.96
14,5	0.6383	0.3617	0.6928	0.3072	0.17	0.67
14,6	0.9623	0.0377	0.8798	0.0202	0.14	0.70
14,7	0.6086	0.3914	0.5292	0.4708	0.33	0.56
14,8	0.4714	0.5286	0.5657	0.4343	0.46	0.49
14,11	0.8165	0.1835	0.7746	0.2254	0.14	0.70
15,2	0.9027	0.0973	0.8944	0.1056	0.01	0.92
15,4	0.9027	0.0973	0.8944	0.1056	0.01	0.92
15,5	0.4303	0.5697	0.4899	0.5101	0.18	0.68
15,7	0.3333	0.6667	0.3464	0.6536	0.01	0.92
15,8	0.4303	0.5697	0.2828	0.7172	1.22	0.26
16,4	0.9428	0.0572	0.9592	0.0408	0.07	0.78
16,5	0.8165	0.1835	0.8246	0.1754	0.005	0.93
16,6	0.7935	0.2065	0.6928	0.3072	0.69	0.40
16,7	0.6086	0.3914	0.4472	0.5528	1.35	0.24
16,8	0.923	0.077	0.9592	0.0408	0.30	0.58

*P<0.02

Cuadro 8. Prueba de χ^2 para la heterogeneidad de las frecuencias alélicas entre sexos de *Chamaedorea alternans* para 31 loci polimórficos.

Locus	Femininos (17)		Masculinos (35)		χ^2	P
	Alelo 0	Alelo 1	Alelo 0	Alelo 1		
9,2	0.343	0.657	0.414	0.586	0.24	0.62
9,3	0.8044	0.1956	0.8452	0.1548	0.13	0.71
9,5	0.7276	0.2724	0.6325	0.3675	0.46	0.49
9,6	0.767	0.233	0.7928	0.2072	0.04	0.83
9,9	0.5941	0.4059	0.414	0.586	1.48	0.22
9,11	0.9075	0.0925	0.8944	0.1056	0.02	0.88
9,12	0.9701	0.0299	0.8106	0.1894	2.45	0.11
13,2	0.2425	0.7575	0.239	0.761	0.001	0.97
13,6	0.5941	0.4059	0.7388	0.2632	1.08	0.29
13,7	0.2425	0.7575	0.239	0.761	0.001	0.97
13,9	0.7276	0.2724	0.5071	0.4929	2.28	0.13
13,10	0.767	0.233	0.7559	0.2441	0.01	0.93
14,1	0.4201	0.5799	0.2928	0.7072	0.83	0.36
14,2	0.8402	0.1598	0.7746	0.2254	0.30	0.58
14,3	0.4851	0.5149	0.378	0.622	0.54	0.46
14,4	0.767	0.233	0.7746	0.2254	0.003	0.95
14,5	0.6417	0.3583	0.6761	0.3239	0.06	0.80
14,6	0.9701	0.0299	0.971	0.029	0.0003	0.98
14,7	0.343	0.657	0.6547	0.3453	4.49	0.03
14,8	0.2425	0.7575	0.6094	0.3906	6.16	0.01*
14,11	0.8402	0.1598	0.7746	0.2254	0.30	0.58
15,2	0.9075	0.0925	0.8944	0.1056	0.02	0.88
15,4	0.8402	0.1598	0.9258	0.0742	0.91	0.33
15,5	0.4201	0.5799	0.4781	0.5219	0.15	0.69
15,7	0.4201	0.5799	0.2928	0.7072	0.83	0.36
15,8	0.343	0.657	0.378	0.622	0.06	0.80
16,4	0.9701	0.0299	0.9411	0.0589	0.20	0.65
16,5	0.767	0.233	0.8452	0.1548	0.47	0.49
16,6	0.686	0.314	0.7746	0.2254	0.47	0.49
16,7	0.5941	0.4059	0.5071	0.4929	0.34	0.55
16,8	0.9701	0.0299	0.9258	0.0742	0.40	0.52

P<0.02

Discusión

Variación genética de la población

Los niveles de variación genética encontrados entre los individuos de *C. alternans* ($H=0.35$) de esta población son elevados en comparación con los reportados para otras especies mediante RAPDs (Cuadro 9). Debido a la alta densidad de individuos y al mecanismo de polinización por viento existe una mayor probabilidad de

apareamiento entre individuos cercanos. Sin embargo, la alta variación genética encontrada y el sistema de apareamiento (tasa de entrecruzamiento = 1) sugieren que *C. alternans* no ha sufrido efectos importantes por deriva génica o por endogamia.

Cuadro 9. Niveles de variación genética en poblaciones vegetales detectados mediante distintos marcadores moleculares.

Especie	Enzimas	RAPDs	Otros	Referencia
<i>Pseudotsuga menziesii</i>			RAPDs mitocondrial	Aagard <i>et al.</i> , 1995
H _t	0.21±0.05	0.49±0.05	0.76	
H _s	0.16±0.03	0.13±0.03	0.29	
G _{ST}	0.26±0.03	0.73±0.09	0.62	
<i>Pinus sylvestris</i>			RAPDs (tejido haploide)	Szmidt <i>et al.</i> , 1996
P	0.70 (20)	0.909 (22)	0.50	
H _T	0.262±0.054	0.356±0.030	0.223±0.049	
G _{ST}	0.022	0.023	0.062	
<i>Populus tremuloides</i>			rFLP	Liu y Fumier, 1993
P	0.77 (14)	1.0 (61)	0.71 (41)	
H _T	0.32±0.06	0.30±0.03	0.35±0.04	
<i>Populus grandidentata</i>				Liu y Fumier, 1993
P	0.29 (14)	0.87 (56)	0.65 (37)	
H _T	0.28±0.11	0.35±0.08	0.19±0.03	
<i>Quercus petraea</i>				Corre <i>et al.</i> , 1997
P		0.65 (48)		
H _T	0.392±0.008	0.239±0.023		
H _s	0.381±0.008	0.233±0.013		
G _{ST}	0.027±0.007	0.024±0.012		
<i>Allium asseae</i>				Smith y Pham, 1996
P		0.57 (65)		
H _T		0.323		
H _s		0.274		
G _{ST}		0.126		
<i>Allium simidimum</i>				Smith y Pham, 1996
P		0.59 (65)		
H _T		0.329		
H _s		0.278		
G _{ST}		0.126		
<i>Argyroxiphium sandwicense</i>				Friar <i>et al.</i> , 1996
P		0.13 (82)		
H _T		0.173±0.068		

En plantas, los RAPDs han mostrado por lo general niveles similares o mayores de polimorfismo que marcadores codominantes (dos Santos *et al.*, 1994; Heun *et al.*, 1994; Cisneros y Quiros, 1995; Lu *et al.*, 1996). En el cuadro 9 observamos algunos de los escasos trabajos en los que se emplean RAPDs y otros marcadores para determinar la estructura genética en especies vegetales. En estos casos no hay un patrón general en los valores de H_T y G_{ST} detectados mediante

RAPDs y otros marcadores. Sin embargo, es necesario tomar en cuenta que en cada trabajo varía el número de loci muestreados, el número de poblaciones, las distancias entre éstas, además del marcador molecular utilizado, afectando las estimaciones de la estructura genética de las especies. No obstante, se han presentado niveles elevados de variación intrapoblacional en especies con fecundación cruzada (Russell *et al.*, 1993; Nesbitt *et al.*, 1995; Yeh *et al.*, 1995; Gunter *et al.*, 1996; Paran *et al.*, 1997) como es el caso de *Ch. alternans* y niveles de variación intrapoblacional menores en especies con autofecundación como *Hordeum spontaneum* y *Mendicago truncatula* por medio de los marcadores RAPDs (Dawson *et al.*, 1993; Bonnin *et al.*, 1996).

Estructura genética de la población

En este trabajo se muestra que la variación genética detectada por los RAPDs en *C. alternans* no se agrupa en subpoblaciones, lo que confirma la existencia de un elevado flujo génico espacial. La diferenciación genética entre subpoblaciones no fue significativa, lo cual indica que las presiones de selección no han permitido una diferenciación local como se ha reportado para las especies de árboles *Abies lasiocarpa* y *Pinus edulis* entre subpoblaciones separadas hasta por menos de 10m, en respuesta a presiones de selección como viento, temperatura o parasitismo (Grant y Mitton, 1977; Mopper *et al.*, 1991 en Linhart y Grant, 1996).

Por otro lado, los valores de G_{st} entre categorías de tamaño, producción de inflorescencias y sexo tampoco fueron significativos. Lo anterior concuerda con los resultados de Bai *et al.* (1997) quienes no encontraron diferencias entre categorías de tamaño en una población de *Panax quinquefoliu* y con los datos reportados para *Astrocaryum mexicanum* en la misma selva, donde tampoco se encontró una correlación entre el tamaño y la heterocigosidad (Eguiarte *et al.*, 1992). En trabajos anteriores se han reportado asociaciones de la variación genética de un locus

codominante y características relacionadas con la adecuación (Wolff y Haeck, 1990; Bush y Smouse, 1991; Lönn *et al.*, 1996). En este trabajo se detectó un locus (13.9) asociado significativamente con la producción de inflorescencias (Cuadro 7).

La diferenciación genética encontrada entre plántulas y adultos reproductivos puede responder a la reproducción diferencial de los individuos, ya que la producción de frutos esta dada principalmente por una pequeña fracción de la población (ver Capítulo anterior). Por otro lado, la dispersión de semillas también juega un papel importante, ya que la variación genética fue mayor en los adultos que en la progenie.

Identificación genética

Los marcadores moleculares RAPDs pueden ser muy útiles en estudios de identificación individual. Este es el primer trabajo con una especie de selva tropical creciendo en su habitat natural, en el que se logra identificar genéticamente a cada individuo reproductivo. Sólo se utilizaron 5 primers con los cuales se lograron identificar 53 loci para los cuales cada una de las palmas adultas resultó genéticamente única (Tabla 1). Esto nos indica la gran variación genética presente en la población de *C. alternans*, ya que estos marcadores son sensibles al grado de diferenciación genética entre las entidades bajo estudio (Otero-Arnaiz *et al.*, 1997). Aunque existen trabajos previos en los que se ha resaltado la capacidad de estos marcadores para detectar variación genética por medio de la identificación de individuos, clones o genets, éstos se han llevado a cabo con plantas cultivadas (p.ej. Wolff *et al.*, 1995; Ko *et al.*, 1996; Miller *et al.*, 1996). Lo anterior ha llevado a sugerir que estos marcadores pueden también ser muy útiles en estudios de sistemas de apareamiento para análisis de paternidad (Lewis y Snow, 1992; Dweikat *et al.*, 1993; Akerman *et al.*, 1995; Gjuric y Smith, 1996). Sin embargo, hasta la fecha no se ha llevado a cabo ningún trabajo de paternidad en poblaciones naturales de plantas utilizando estos marcadores.

En conclusión, se puede decir que la población de *C alternans* presenta elevados niveles de variación genética detectados por los RAPDs, lo cual sugiere un elevado flujo génico y que la deriva génica no ha tenido efectos importantes sobre la población. No se presenta una estructura genética entre subpoblaciones, categorías de tamaño, producción de inflorescencias o sexo, es decir, que la diferenciación genética es mayor entre los individuos que entre las categorías consideradas en este estudio. La variación genética entre individuos permitió identificar a cada individuo reproductivo mediante el patrón de bandeo determinado por los RAPDs.

Literatura citada

- Aagard, J.E., S.S. Vollmer, F.C. Sorensen y S.H. Strauss. 1995. Mitochondrial DNA products among RAPD profiles are frequent and strongly differentiated between races of Douglas-fir. *Molecular Ecology* **4**:441-447.
- Akerman, S., J. Tammissola, S.P. Lapinjoki, H. Soderlund, V. Kauppinen, A. Vihera-Aarnio, M. Regina y R. Hagqvist. 1995. RAPD markers in parentage confirmation of a valuable breeding progeny of European white birch. *Canadian Journal of Forest Research* **25**:1070-1076.
- Alvarez-Buylla, E.R. y A. Garay. Population genetics structure of *Cecropia obtusifolia*, a tropical pioneer tree species. *Evolution* **48**:437-453.
- Backeljau T., L. de Bruyn, H. de Wolf, K. Jordaens, S. van Dongen, R. Verhagen y B. Winnepenninckx. 1995. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) and parsimony methods. *Cladistics* **11**:119-130.
- Bachmann, K. 1994. Molecular markers in plant ecology. *New Phytologist* **126**:403-418.
- Bai D., J. Brandle y R. Reeleder. 1997. Genetic diversity in North American ginseng (*Panax quinquefolius* L.) grown in Ontario detected by RAPD analysis. *Genome* **40**:111-115.
- Baker, H.G., K.S. Bawa, G.W. Frankie y P.A. Opler. 1983. Reproductive biology of plants in tropical forest. En: Golley, F.B. (ed.). *Tropical Rain Forest Ecosystems: Structure and Function*. Ecosystems of the World 14A. Elsevier Scientific Publishers, Amsterdam. pp 183-215.
- Bawa, K.S. 1974. Breeding systems of tree species of a lowland tropical community. *Evolution* **28**:85-92.
- Bawa, K.S. 1980. Evolution of dioecy in flowering plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* **11**:15-19.
- Bawa, K.S. 1990. Plant-pollinator interactions, sexual systems and pollen flow. Comentario. En: Bawa K.S. y M. Hadley (eds.). *Reproductive Ecology of Tropical Forest Plants*. Man and the Biosphere Series. Vol. 7. UNESCO. Paris. pp.65-68.
- Bawa, K.S. y P.A. Opler. 1975. Dioecism in tropical forest trees. *Evolution* **29**:167-179.
- Bawa, K.S. y P.S. Ashton. 1991. Conservation of rare trees in tropical rain forest: a genetic perspective. En: Falk, D. y K. Holsinger (eds.). *Biology of Rare Plants: Implications for Conservation and Management*. Oxford University Press, London. pp 62-71.
- Bawa, K.S. y S.L. Krugman. 1991. Reproductive Biology and Genetics of Tropical Trees in Relation to Conservation and Management. En: *Rain Forest Regeneration and Management*. Man and the Biosphere Series. Vol. 6. UNESCO. Paris. pp. 119-133.
- Bawa, K.S., D.R. Perry y J.H. Beach. 1985. Reproductive biology of tropical lowland rain forest trees. I. Sexual systems and incompatibility mechanisms. *American Journal of Botany* **72**:331-345.

- Bongers, F., J. Popma, J. Meave del Castillo y J. Carabias. 1988. Structure and floristic composition on the lowland rain forest of Los Tuxtlas, Mexico. *Vegetatio* **74**:55-80.
- Bonnin, Y., T. Huguet, M. Gherardi, J.-M. Prosperi y Y. Olivieri. 1996. High level of polymorphism and spatial structure in a selfing plant species, *Medicago truncatula* (Leguminosae), shown using RAPD markers. *American Journal of Botany* **83**:843-855.
- Boshier, D.H., M.R. Chase y K.S. Bawa. 1995. Population genetics of *Cordia alliodora* (Boraginaceae), a neotropical tree. 2. Mating system. *American Journal of Botany* **82**:476-483.
- Brauner S., D.J. Crawford y T.F. Stuessy 1992. Ribosomal DNA and RAPD variation in the rare plant family Lactoridaceae. *American Journal of Botany* **79**:1436-1439.
- Bullock, S.H. 1985. Breeding systems in the flora of a tropical deciduous forest in Mexico. *Biotropica* **17**:287-301.
- Bush, R.M. y P.E. Smouse. 1991. The impact of electrophoretic genotype on life history traits in *Pinus taeda*. *Evolution* **45**:481-498.
- Caetano-Anolles, G., G.J. Bassam y P.M. Gresshof. 1991. High resolution DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers. *Biotechnology* **9**:553-556.
- Cisneros, P.L. y C.F. Quiros. 1995. Variation and phylogeny of the triploid cultivated potato *Solanum chaucha* Juz. et Buk. based on RAPD and isozyme markers. *Genetic Resources and Crop Evolution* **42**:373-386.
- Clark, A.G. y C.M.S. Lanigan. 1993. Prospects for estimating nucleotide divergence with RAPDs. *Molecular Biology Evolution* **10**: 1096-1111.
- Corre, V.L., S. Dumolin-Lapègue y A. Kremer. 1997. Genetic variation at allozyme and RAPD loci in sessile oak *Quercus petraea* (Matt.) Liebl.: the role of history and biogeography. *Molecular Ecology* **6**:519-529.
- Crawford, T.J. 1984. What is a population? En: Shorrocks, B. (ed.). *Evolutionary Ecology*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, England.
- Chalmers, K.J., R. Waugh, J.I. Sprent, A.J. Simons y W. Powell. 1992. Detection of genetic variation between and within populations of *Gliricidia sepium* and *G. maculata* using RAPD markers. *Heredity* **69**: 465-472.
- Dawson, I.K., K.J. Chalmers, R. Waugh y W. Powell. 1993. Detection and analysis of genetic variation in *Hordeum spontaneum* populations from Israel using RAPD markers. *Molecular Ecology* **2**:151-159.
- de la Cruz, M., R. Whitkus y L. Mota-Bravo. 1995. Tropical tree DNA isolation and amplification. *Molecular Ecology* **4**:787-789.
- dos Santos, J.B., J. Nienhuis, P. Skroch, J. Tivang y M.K. Slocum. 1994. Comparison of RAPD and RFLP genetic markers in determining genetic similarity among *Brassica oleraceae* L. genotypes. *Theoretical and Applied Genetics* **87**:909-915.

- Dweikat, Y., S. Mackenzie, M. Levy y H. Ohm. 1993. Pedigree assessment using RAPD-DGGE in cereal crop species. *Theoretical and Applied Genetics* **85**:497-505.
- Eguiarte, L.E., N. Pérez-Nasser y D. Piñero. 1992. Genetic structure, outcrossing rate and heterosis in *Astrocaryum mexicanum* (tropical palm): implications for evolution and conservation. *Heredity* **69**:217-228.
- Fleming, T.H. y E.R. Heithaus. 1981. Frugivorous bats, seed shadows, and the structure of tropical forest. *Biotropica* **13**:45-53.
- Friar E.A., R.H. Robichaux y D.W. Mount 1996. Molecular genetic variation following a population crash in the endangered Mauna Kea silversword, *Argyroxiphium sandwicense* ssp. *sandwicense* (Asteraceae). *Molecular Ecology* **5**:687-691.
- Fritsch, P. y L.H. Rieseberg. 1992. High outcrossing rates maintain male hermaphrodite individuals in populations of the flowering plant *Datisca glomerata*. *Nature* **359**:633-636.
- Cjuric, R. y S.P. Smith Jr. 1996. Identification of cross-pollinated and self-pollinated progeny in alfalfa through RAPD nulliplex loci analysis. *Crop Science* **36**:389-393.
- Grant, M.C. y J.B. Mitton. 1977. Genetic differentiation among growth forms of Engelmann spruce and subalpine fir at tree line. *Arctic Alpine Research* **9**: 259-263.
- Gunter, L.E., G.A. Tuskan y S.D. Wulschleger. 1996. Diversity among populations of switchgrass based on RAPD markers. *Crop Science* **36**:1017-1022.
- Gustafsson L. y P. Gustafsson. 1994. Low genetic variation in Swedish populations of the rare species *Vicia pisiformis* (Fabaceae) revealed with RFLP (rDNA) and RAPD. *Plant Systematics and Evolution* **189**:133-148.
- Hamrick, J.L. 1990. Isozymes and the analysis of genetic structure in plant populations. *En: Soltis, E.D. y P.S. Soltis (eds.). Isozymes in Plant Biology*. Chapman and Hall, London, pp 87-105.
- Hamrick, J.L. y M.D. Loveless. 1986. The influence of seed dispersal mechanisms on the genetic structure of plant populations. *En: Estrada, A. y T.H. Fleming (eds.). Frugivores and Seed dispersal*. Dr. W. Junk Publishers. pp 211-223.
- Hamrick, J.L., D.A. Murawski y John Nason. 1993. The influence of seed dispersal mechanisms on the genetic structure of tropical tree populations. *Vegetatio* **107/108**:281-297.
- Hamrick, J.L., M.J.W. Godt y S.L. Sherman-Broyles. 1992. Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species. *New Forest* **6**:95-124.
- Hamrick, J.L. y M.J.W. Godt. 1989. Allozyme diversity in plant species. *En: Brown, A.H.D., M.T. Clegg, A.L. Kahler y B.S. Weir (eds.). Plant Population Genetics, Breeding and Genetic Resources*. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA. pp. 44-64.
- Harris. H. 1966. Enzyme polymorphisms in man. *Proceedings of Royal Society of London. B* **164**:298-310.

- Hartl, D.L. y A.G. Clark. 1989. *Principles of Population Genetics*. Sinauer Assc Massachusetts, USA.
- Heun, M., J.P. Murphy y T.D. Phillips. 1994. A comparison of RAPD and isozyme analyses for determining the genetic relationships among *Avena sterilis* L. accessions. *Theoretical and Applied Genetics* **87**:689-696.
- Howe, H.F. 1990. Seed dispersal by birds and mammals: Implications for seedling demography. En: Bawa K.S. y M. Hadley (eds.). *Reproductive Ecology of Tropical Forest Plants*. Man and the biosphere Series, Vol. 7. UNESCO y Parthenon Publishing Group, Paris. pp.191-218.
- Howe, H.F. 1989. Scatter- and clump-dispersal and seedling demography: hypothesis and implications. *Oecologia* **79**:417-426.
- Howe, H.F., E.W. Schupp y L.C. Westley. 1985. Early consequences of seed dispersal for a neotropical tree (*Virola surinamensis*). *Ecology* **66**:781-791.
- Hubbell, S.P. y R.B. Foster. 1983. Diversity of canopy trees in a neotropical forest and implications for conservation. En: Sutton, S.L., T.C. Whitmore y S. Chadwick (Eds.), *Tropical Rain Forest: Ecology and Management*. Blackwell Scientific Publications, London.
- Jeffreys, A.J., V. Wilson y S.L. Thein. 1985. Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA. *Nature* **314**: 67-73.
- Ko, H.L., R.J. Henry, P.R. Beal, J.A. Moisaner y K.A. Fisher. 1996. Distinction of *Ozothamnus diosmifolius* (Vent.) DC genotypes using RAPD. *Hortscience* **31**: 858-861.
- Levin, D.A. 1981. Dispersal versus gene flow in seed plants. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **68**:233-253.
- Levin, D.A. 1988. Local differentiation and the breeding structure of plant populations. En: Gottlieb, L.D. y S.K. Jain (eds.). *Plant Evolutionary biology*. Chapman and Hall. London. pp 305-329.
- Lewis, P.O. y A.A. Snow. 1992. Deterministic paternity exclusion using RAPD markers. *Molecular Ecology* **1**:155-160.
- Lewontin, R.C. y J.L. Hubby. 1966. A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations. II. Amount of variation and degree of heterozygosity in natural populations of *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics* **54**:595-609.
- Linhart, Y.B. y M.C. Grant. 1996. Evolutionary significance of local genetic differentiation in plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* **27**:237-277.
- Liu, Z. y G.R. Furnier. 1993. Comparison of allozyme, RFLP, and RAPD markers for revealing genetic variation within and between trembling aspen and bigtooth aspen. *Theoretical and Applied Genetics* **87**:97-105.
- Lönn, M., H.C. Prentice y K. Bengtsson. 1996. Genetic structure, allozyme-habitat associations and reproductive fitness in *Gypsophila fastigiata* (Caryophyllaceae). *Oecologia* **106**:308-316

- Loveless, M.D. 1992. Isozyme variation in tropical trees: patterns of genetic organization. *New Forests* **6**:67-94.
- Lu, J., M.R. Knox, M.J. Ambrose, J.K.M. Brown y T.H.N. Ellis. 1996. Comparative analysis of genetic diversity in pea assessed by RFLP- and PCR-based methods. *Theoretical and Applied Genetics* **93**:1103-1111
- Lynch, M. y B.G. Milligan. 1994. Analysis of population genetic structure whit RAPD markers. *Molecular Ecology* **3**:9199
- McCauley, D.E. 1994. Contrasting the distribution of chloroplast DNA and allozyme polymorphism among local populations of *Silene alba*: implications for studies of gene flow in plants. *Proceedings of National Academy of Science USA*. **91**: 8127-8131.
- Miller, A.C.E., C.P. Brookers, H.D. Loxdale, G.W. Cussans. 1996. Using RAPD markers to identify genets of an arable grass weed, *Arrhenatherum elatius* spp. bulbosum. *Annals of Applied Biology*. **129**: 71-82.
- Mopper, S., J.B. Mitton, T.G. Whitham y K.M. Christensen. 1991 Genetic differentiation and heterozygosity in pinyon pine associated with herbivory and enviromental stress. *Evolution* **45**: 989-999.
- Morgante, M. y A. Olivieri. 1993. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. *Plant Journal* **3**: 175-182.
- Mosseler, A., K.N. Egger y G.A. Hughes. 1992. Low levels of genetic diversity in red pine confirmed by random amplified polymorphic DNA markers. *Canadian Journal of Forest Research* **22**:1332-1337.
- Murawski, D.A, B. Dayanandan y K.S. Bawa. 1994. Outcrossing rates of two endemic *Shorea* species from Sri Lankan tropical rain forest. *Biotropica* **26**:23-29.
- Murawski, D.A. y J.L. Hamrick. 1991. The effect of the density of flowering individuals on the mating systems of nine tropical tree species. *Heredity* **67**:167-174.
- Murawski, D.A., J.L. Hamrick, S.P. Hubbell y R.B. Foster. 1990. Mating systems of two Bombabacaceous trees of a neotropical moist forest. *Oecologia* **82**:501-506 .
- Nei, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of National Academy of Science. USA* **70**:3321-3323.
- Nei, M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press. New York, USA.
- Nesbitt, K.A., B.M. Potts, R.E. Vaillancourt, A.K. West y J.B. Reid. 1995. Partitioning and distribution of RAPD variation in a forest tree species, *Eucalyptus globulus* (Myrtaceae). *Heredity* **74**:628-637.
- Nybom H. y H.K. Hall. 1991. Minisatellite DNA 'fingerprints' can distinguish *Rubus* cultivars and estimate their degree of relatedness. *Euphytica* **53**:107-114.
- O'Malley, D.M. y K.S. Bawa. 1987. Mating systems of a tropical rain forest tree species. *American Journal of Botany* **74**:1143-1149.
- O'Malley, D.M., D.P. Buckley, G.T. Prance y K.S. Bawa. 1988. Genetics of Brazil nut (*Bertholletia excelsa* Humb. & Bonpl.: Lecythidaceae). 2. Mating system. *Theoretical and Applied Genetics* **76**:929-932.

- Otero-Amaiz A., M. de la Cruz y K. Oyama. 1997. El uso de los marcadores moleculares RAPDs en plantas. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* **60**:85-117.
- Oyama, K. 1984. Biología comparativa entre individuos masculinos y femeninos de *Chamaedorea tepejilote* (Palmae). Tesis de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. México.
- Oyama, K. 1987. Demografía y dinámica poblacional de *Chamaedorea tepejilote* Liebm. (Palmae) en la selva de Los Tuxtlas, Veracruz (México). Tesis de Maestría en Ciencias. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México México.
- Oyama, K. 1990. Variation in growth and reproduction in the Neotropical dioecious palm *Chamaedorea tepejilote*. *Journal of Ecology* **78**:648-663.
- Oyama, K. 1991. Seed predation by a curculionid beetle on the dioecious palm *Chamaedorea tepejilote*. *Principes* **35**:156-160.
- Oyama, K. 1993. Are age and height correlated in *Chamaedorea tepejilote* (Palmae)? *Journal of Tropical Ecology* **9**:381-385.
- Oyama, K. y A. Mendoza. 1990. Effects of defoliation on growth, reproduction and survival of a Neotropical dioecious palm *Chamaedorea tepejilote*. *Biotropica* **22**:119-123.
- Oyama, K. y R. Dirzo. 1991. Ecological aspects of the interaction between *Chamaedorea tepejilote*, a dioecious palm and *Calyptocephala marginipennis*, a herbivorous beetle, in a Mexican rain forest. *Principes* **35**:86-93.
- Paran, I., D. Gidoni y R. Jacobsohn. 1997. Variation between and within broomrape (Orobanchaceae) species revealed by RAPD markers. *Heredity* **78**:68-74.
- Peakall, R., P.E. Smouse y D.R. Huff. 1995. Evolutionary implications of allozyme and RAPD variation in diploid populations of dioecious buffalograss *Buchloe dactyloides*. *Molecular Ecology* **4**:135-147.
- Roelofs, D. y K. Bachmann. 1995. Chloroplast and nuclear DNA variation among homozygous plants in a population of the autogamous annual *Microseris douglasii* (Asteraceae, Lactuceae). *Plant Systematics and Evolution* **196**:185-194.
- Rossetto, M., P.K. Weaver y K.W. Dixon 1995. Use of RAPD analysis in devising conservation strategies for the rare and endangered *Grevillea scapigera* (Proteaceae). *Molecular Ecology* **4**:321-329.
- Russell, J.R., F. Hosein, E. Johnson, R. Waugh y W. Powell. 1993. Genetic differentiation of cocoa (*Theobroma cacao* L.) populations revealed by RAPD analysis. *Molecular Ecology* **2**:89-97.
- Saiki, R.K., S. Scharf, F. Faloona, K.B. Mullis, G.T. Horn, H.A. Erlich, N. Arnheim 1985. Enzymatic amplification of β -Globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**:1350-1354.

- Schaal, B.A., W.J. Leverich y S.H. Rogstad. 1991. A comparison of methods for assessing genetic variation in plant conservation biology. *En: Falk D.A. y K.E. Holsinger (eds.). Genetics and Conservation of Rare Plants*. Oxford University Press.
- Scharf, S.J., G.T. Horn y H.A. Erlich. 1986. Direct cloning and sequence analysis of enzymatically amplified genomic sequences. *Science* **233**:1076-1078.
- Silvertown, J.W. y J. Lovett Doust. 1993. *Introduction to Population Biology*. Blackwell Scientific Publications. Oxford. 197 pp.
- Slatkin, M. 1993. Isolation by distance in equilibrium and non-equilibrium populations. *Evolution* **47**:264-279.
- Slatkin, M. y N.H. Barton. 1989. A comparison of three indirect methods for estimating average levels of gene flow. *Evolution* **43**: 1349-1368.
- Smith, J.F. y T.V. Pham. 1996. Genetic diversity of the narrow endemic *Allium aaseae* (Alliaceae). *American Journal of Botany* **83**:717-726
- Stewart, C.N.Jr. y L. Excoffier. 1996. Assessing population genetic structure and variability with RAPD data: Application to *Vaccinium macrocarpon* (American Cranberry). *Journal of Evolutionary Biology* **9**:153-171.
- Szmidt, A.E., X.-R. Wang y M.-Z. Lu. 1996. Empirical assessment of allozyme and RAPD variation in *Pinus sylvestris* (L.) using haploid tissue analysis. *Heredity* **76**:412-420.
- Tuskan G.A., K.E. Francis, S.L. Russ, W.H. Romme y M.G. Turner. 1996. RAPD markers reveal diversity within and among clonal and seedling stands of Aspen in Yellowstone National Park, U.S.A. *Canadian Journal of Forest Research*. **26**:2088-2098.
- Weisiin, K., H. Nybon, K. Wolff y W. Meyer. 1995. *DNA fingerprinting in plants and fungi*. CRC Press. Boca Raton, Florida. pg. 30.
- Welsh J. y M. McClelland. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research* **18**:7213-7218.
- Whitkus, R., M. de la Cruz, L. Mota-Bravo y A. Gómez-Pompa. 1998. Genetic diversity of tropical crops maintained by ancient cultures: an example in Cacao. *Theoretical and Applied Genetics* (en prensa).
- Williams, J.G.K., A.R. Kubelik, K.J. Livak, J.A. Rafalski y S.V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are usefull as genetic markers. *Nucleic Acids Research* **18**:6531-6535.
- Wolff, K. y J. Haeck. 1990. Genetic analysis of ecologically relevant morphological variability in *Plantago lanceolata* L. VI. The relation between allozyme heterozygosity and some fitness components. *Journal of Evolutionary Biology* **3**:243-255.
- Wolff, K., E. Ziolkiewicz y H. Hofstra. 1995. Identification of chrysanthemum cultivars and stability of DNA fingerprint patterns. *Theoretical and Applied Genetics* **91**: 439-447.

- Yeh, F.C., D.K.X Chong y R.-C. Yang. 1995. RAPD variation within and among natural populations of trembling aspen (*Populus tremuloides* Michx.) from Alberta. *Journal of Heredity* **86**:454-460.
- Yeh, F.C., R.-C. Yang, B.J.T. Boyle, Z.-H. Ye y J.X. Mao. 1997. *POPGENE, the user-friendly shareware for population genetic analysis*. Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta, Canada.

Discusión y conclusiones generales

Ch. alternans presentó gran variación interindividual en el tiempo de la floración y en el número de flores e inflorescencias, lo cual se refleja en la producción de frutos. Esta variación no responde a la altura de la planta, es decir que las plantas con una mayor capacidad potencial de obtener recursos no son las que presentaron un evento reproductivo más exitoso. El éxito de este evento reproductivo se vio limitado por la disponibilidad de polen a un radio de distancia de 5 a 7m. Lo cual da indicios de que debido al mecanismo de polinización, la dispersión del polen en esta especie puede ser una función leptokúrtica de la distancia, con algunos eventos raros de dispersión de polen a distancias mayores.

Si bien, se han reportado distancias de dispersión de polen por viento de más de 500 m en coníferas con tasas de migración entre poblaciones altas (Hamrick, 1989), las condiciones ambientales del sotobosque de la selva creadas por la estructura de la vegetación y la elevada humedad relativa y precipitación durante la época de floración de *Ch. alternans* contribuyen para limitar la dispersión del polen por viento. Aunque la tasa de migración calculada para las subpoblaciones separadas por aproximadamente 10m es suficiente para evitar una diferenciación. Como se ha mencionado anteriormente el flujo génico es uno de los principales factores que moldean la estructura genética de la población. El flujo génico está dado por la dispersión de polen y de semillas. Para *Ch. alternans*

la dispersión de semillas por aves (Trejo-Pérez, 1989 ; Escalona,1989) parece contribuir en mayor grado al flujo génico que la dispersión del polen. Aunque esto sólo puede ser probado mediante el establecimiento de las distancias reales de polinización.

Los RAPDs son marcadores moleculares que revelan niveles elevados de polimorfismo dentro y entre poblaciones en comparación con los RFLPs o las enzimas (van Heusden y Bachmann, 1992), aunque no como regla general (ver Liu y Furnier, 1993 ; Core *et al.* 1997). Se han utilizado en distintas aplicaciones y aunque el uso de este marcador es más adecuado en estudios de poblaciones o de especies cercanas son pocos los que se han llevado a cabo hasta la fecha con poblaciones naturales y aún menos con especies tropicales (Otero *et al.* , 1997).

No se detecto una diferenciación genética local entre subpoblaciones, categorías de tamaño, producción de inflorescencias ni sexo mediante los marcadores moleculares RAPDs. Los elevados niveles de variación y la gran diferenciación genética encontrados entre los individuos de *Ch. alternans*, así como la elevada tasa de migración indican que el flujo génico se presenta a distancias mayores que la distancia entre conoespecíficos y sugieren que la población no ha sufrido efectos importantes por deriva génica o por endogamia. Estos resultados coinciden con los patrones encontrados para otras especies tropicales mediante enzimas (Loveless, 1992).

Las estrategias de manejo que se sugieren con base en los resultados de este trabajo son conservar poblaciones con un gran número de individuos para mantener la elevada variación genética y flujo génico, por lo que la única forma de conservar esta especie es manteniéndola *in situ*, ya que sería muy complicada la conservación de gran parte de la variación genética mediante bancos de germoplasma.

Teniendo establecidas las distancias entre los individuos, las coincidencias en la floración y la identificación genética mediante RAPDs se podrán hacer inferencias sobre las relaciones de parentesco dentro de la población y con ello establecer las distancias reales de dispersión de polen.

Agradecimientos

Agradezco de manera especial al Dr. Ken Oyama, su amistad y entusiasmo como director de esta tesis. Todas sus sugerencias, apoyo logístico y discusiones han sido esenciales para llevar a término esta tesis. Le agradezco sobretodo el adentrarme en el conocimiento de la biología molecular como una herramienta para la conservación y restauración de los ecosistemas del país.

Agradezco a los miembros del comité tutorial. A la Dra. Marlene de la Cruz el facilitarme equipo y material, así como sus sugerencias durante el desarrollo de este trabajo. Al Dr. Miguel Martínez Ramos le agradezco todas sus sugerencias desde la planeación y durante el seguimiento del desarrollo del trabajo. Sus comentarios sobre el planteamiento y el análisis de datos siempre fueron muy acertadas y útiles, de igual forma le agradezco todos sus consejos prácticos para la vida.

A los sinodales Dr. Luis Eguiarte, Dr. Arturo Flores, Dra. Ana Mendoza y Dr. Rafael Durán les agradezco su cuidadosa revisión de la tesis, todos sus comentarios sirvieron para mejorar el trabajo.

A todas las personas que de distintas formas me apoyaron para poder realizar este trabajo. A Fabiola Ramírez por su motivación en el trabajo de laboratorio. Por los meses de trabajo compartidos aprendiendo juntas. Al Dr. Daniel Piñero el permitirme realizar gran parte del trabajo en su laboratorio. A Jorge Chirinos, Pablo Cuevas y Antonio González por su ayuda en el trabajo de campo. A todos los compañeros del laboratorio de Genética Molecular y Evolución por hacer placentero el trabajo. Muy especialmente a Rosalinda Tapia por todo su tiempo dedicado a resolverme dudas técnicas y administrativas.

Agradezco también Guillermo Ibarra quien sin ser parte de los sinodales revisó el manuscrito y me hizo comentarios importantes. Su apoyo económico y con el cuidado de mis hijos fue indispensable, sobre todo durante los últimos seis meses. A todas las personas del Campus Morelia que con su entusiasmo y confianza me motivaron durante la etapa de escritura del trabajo.