

UNIVERSIDAD NACIONAL DE AGRICULTURA

**IDENTIFICACIÓN DE CULTIVARES EN SEASHORE PASPALUM
(*Paspalum vaginatum* O. Swartz) Y EVALUACIÓN DE LA RELACIÓN
GENÉTICA USANDO CEBADORES DE SECUENCIAS SIMPLES
REPETIDAS (SSR)**

POR:

JOSUÉ ALBERTO PUERTO RODRIGUEZ

TESIS

**PRESENTADA A LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE AGRICULTURA COMO
REQUISITO PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE**

INGENIERO AGRÓNOMO



CATACAMA, OLANCHO

HONDURAS

MARZO, 2013

IDENTIFICACIÓN DE CULTIVARES EN SEASHORE PASPALUM
(*Paspalum vaginatum* O. Swartz) Y EVALUACIÓN DE LA RELACIÓN
GENÉTICA USANDO CEBADORES DE SECUENCIAS SIMPLES
REPETIDAS (SSR)

POR:

JOSUÉ ALBERTO PUERTO RODRÍGUEZ

HECTOR DIAZ, I.A. M. Sc.

Asesor Principal (Honduras, UNA)

ZHEN BANG CHEN, PhD

Asesor (USA, UGA)

TESIS

PRESENTADO A LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE AGRICULTURA COMO
REQUISITO PREVIO A LA OBTENCION DEL TITULO DE
INGENIERO AGRONÓMO

CATACAMAS, OLANCHO

HONDURAS

MARZO, 2013

DEDICATORIA

AL DIOS TODO PODEROSO: creador de todo lo existente a nuestro alrededor, por darme todo lo necesario, para poder culminar con mi carrera universitaria.

A MIS PADRES: Justo Roberto Puerto Tinoco, de su mano. Cristina Rodríguez, En la estela de mi corazón

A MIS HERMANOS: Rosibel Puerto Rodríguez y Cristian Eduardo Puerto Rodríguez. Por el apoyo incondicional durante todos mis estudios.

AGREDICIMIENTO

Esta es probable la parte más importante y difícil de ser expresada, agradecer a cada una de las personas que de una u otra forma me ofrecieron su apoyo incondicional para llevar a cabo este trabajo. Yo nunca hubiera hecho nada de esto, en particular en tal área de estudio, sin el apoyo incondicional de cada uno de ellos. Incluyendo también, las instituciones que me ayudó para serlo este trabajo posible.

Primero, me gustaría agradecer a mis asesores; Héctor Díaz y Zhenbang Chen. Ellos han dedicado mucho tiempo y siempre han sido muy pacientes para aclararme cualquier tipo de dudas. Agradecer el recibimiento y apoyo permanente de los miembros del departamento de Biología Vegetal y Edafología de la Universidad de Georgia. Como también dar gracias a los miembros de mi comité de la Universidad Nacional de Agricultura; Hilsy Sanabria y Rubén Sincler, por la revisión de mi investigación y sus consejos, ellos han sido de gran ayuda para mantenerme enfocado en lo importante del proyecto, mostrándome los pequeños detalles.

A toda mi familia, que es lo más valioso que tengo, a mi madre, mi padre, mis hermanos, primos, tíos, y ahora más a que nunca sé cuánto significa en mi vida

También me complace mucho agradecer a Miss Katrina, ella fue quien me ayudó con los trámites para poder viajar al exterior y poder hacer posible esta tesis. Sin olvidar al Dr. Marlon Escoto quien intervino con el Presidente de la República Porfirio Lobo Sosa para el financiamiento del transporte. Las autoridades de la Universidad de Georgia, por financiar la vivienda y alimentación.

CONTENIDO

DEDICATORIA	ii
AGREDICIMIENTO	iii
LISTA DE TABLAS.....	vi
LISTA DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE ANEXOS.....	viii
RESUMEN	ix
I INTRODUCCIÓN.....	10
II OBJETIVO	10
2.1 General.....	10
2.2 Específicos	10
IV. REVISION DE LITERATURA	11
4.1 Generalidades.....	11
4.1.1 Centros de Origen.....	11
4.1.2 Zona de adaptación.....	11
4.1.3 Dispersión.....	5
4.1.4 Clasificación Taxonómica	5
4.1.5 Características.....	6
4.1.6 Número de cromosoma/Citología.....	6
4.2 Necesidades de caracterización.....	8
4.3 Los métodos tradicionales de caracterización.....	8
4.4 Limitaciones de los métodos tradicionales	9
4.5 Marcadores Moleculares	9
4.5.1 Microsatélite o secuencias simples repetidas (SSR).....	10
4.5.2 Marcadores SSR en contraste con otros marcadores.....	10
5.6 La aplicación de marcadores SSR para evaluar la diversidad en otros cultivos....	11
IV MATERIALES Y MÉTODOS.....	13
5.1 Localización del sitio de estudio.....	13
5.2 Material vegetal	13
5.3 Extracción de ADN.....	13

5.4	Amplificación de PCR.....	14
5.5	Separación de fragmento de PCR y análisis de datos	15
V	RESULTADO Y DISCUSIÓN.....	17
5.1	Caracterización marcadores SSR.....	17
5.2	La diversidad genética entre los cultivares de Seashore paspalum	18
5.3	Distinción y caracterización entre los cultivares	20
VI	CONCLUSIONES.....	22
VII.	RECOMENDACIÓN	23
VIII.	BIBLIOGRAFIA	24
ANEXOS		28

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Selección de los materiales de césped	13
Tabla 2. Cebadores utilizados y el número de fragmentos polimórficos resultante de cada uno	14
Tabla 3. Valor de disimilaridad para cada combinación de pares del genotipos de Seashore paspalum basados en marcadores SSR.....	18

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** SSR patrones de cultivares de Seashore paspalum y selecciones producidos por los cebadores 2452, 2083, 3211, 988, 2848 y 3743: (A) Azul, (B) Aloha, (C) Durban, (D) Sea Dawlf, (E) Salam, (F) SI-1, (G) SI-2k, (H) Supreme. 17
- Figura 2.** Demógrama representando la relación genética entre 8 cultivares de Seashore paspalum basados en el análisis de clúster NTSYS a partir de los datos obtenidos de los valores de similitud..... 19

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Protocolo de Extracción de DNA	29
Anexo 2. Los marcadores SSR más útiles para distinguir los cultivares de Seashore paspalum expresados de menor a mayor tamaño molecular.....	30

Puerto JA. Identificación de cultivares en Seashore paspalum (*Paspalum vaginatum* O. Swartz) y evaluación de la relación genética usando cebadores de secuencias simples repetidas (SSR) Tesis Ing. Agr. Universidad Nacional de Agricultura, Catacamas, Olancho, Honduras. Pag. 37

RESUMEN

Ocho cultivares de Seashore paspalum (*Paspalum vaginatum* O. swartz) Azul, Aloha, Durban, Sea Dawlf, Salam, SI-1, SI-2K y Supreme seleccionadas en invernadero, fueron analizados usando treinticuatro pares de cebadores de 24- pares de bases nitrogenadas cada una. El objetivo de este trabajo fue determinar la diversidad genética y construir una tabla de huella molecular en ADN que permita la caracterización entre los cultivares mediante marcadores de secuencias simples repetidas (SSR). En cada par de cebadores se realizó la técnica conocida como PCR (Reacción de cadena de polimerasa) (Kary Mullis 1983). El análisis de los productos de PCR reveló un total de 78 alelos polimórficos, con un rango de 2 a 8 alelos y un promedio de 4.14 alelos por locus dentro de los 8 cultivares examinados. Se calculó la matriz de disimilaridad en base a 348 bandas SSR para luego construir un demograma con el método UPGMA (Sokal R y Michener C 1958) (Murtagh F 1984) sobre la base de disimilaridad. Los 8 cultivares estudiados mostraron coeficientes de disimilitud genética en un rango de 3.08 a 7.33 y un coeficiente promedio de 6.27. Así mismo, los cultivares se clasificaron en 3 grupos dentro de un coeficiente del 30.8% hasta 68% de disimilaridad. Los resultados de este trabajo revelan que los marcadores SSR son una herramienta útil para medir la diversidad genética entre los cultivares de Seashore paspalum y podría ser usados para resolver asuntos de identificación que se dificultan en la caracterización morfológica y de esta forma asegurar los derechos de obtentor.

Palabras claves: ADN, Cebadores SSR, Diversidad genética, Huella Genética

I INTRODUCCIÓN

Seashore paspalum (*Paspalum vaginatum* Swartz, $2n=2x=20$), también conocido como siltgrass, grama de agua o saltwater couch en Australia, es ecológicamente agresivo, de rápido crecimiento, hierba perenne auto-incompatible y de clima cálido. Paspalum es un género grande, que se encuentra salvajemente en la costa marítima de ambos hemisferios y contiene más de 400 especies. Seashore paspalum evoluciona a partir del contacto constante con la arena y agua salinas, lo que le permitió expresar la tolerancia a salinidades superiores en comparación con los cultivares de bermuda (Lee 2000).

Existe una creciente demanda para el desarrollo y mejoras de nuevos cultivares para cumplir con los desafíos y restricciones ambientales. Esto se traduce en el desarrollo y lanzamiento de muchas variedades y cultivares de césped durante cada año. La identificación confiable y definitiva de cultivares se ha convertido en crítica para mantener la pureza varietal y proteger los derechos de autor.

Los marcadores moleculares son herramientas poderosas para el estudio de la variación genética y asociado a la variación genotípica (Varshney *et al.* 2005). AFLPs polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados (Chen *et al.* 2009) y RAPDs marcadores polimorfismos amplificados al azar (Liu *et al.* 1994) se han utilizado tanto para la identificación de cultivares y determinación la diversidad genética en especies de Seashore paspalum. Sin embargo, este método tiene sus limitaciones.

SSR (Secuencias simples repetidas) muestran una alta reproductividad y cobertura genómica, son marcadores co-dominante, neutralizados y son altamente polimórficos (Spooner *et al.* 2005). Por lo tanto se han utilizado ampliamente para estudiar la variabilidad genética en diferentes organismos.

La asistencia por marcadores para la identificación de cultivares, utilizando SSRs, puede tener implicaciones prácticas para los criadores de césped y administradores. Debido a que son altamente polimórficos y pueden identificar a los individuos con una huella digital única, es posible que los SSR puedan ser utilizados para clones de identificación parental, el desarrollo de nuevos cultivares para maximizar vigor híbrido y la diversidad genética (Xu 2003 y Cho *et al.* 2004).

En tal sentido se ha planteado este trabajo de investigación que tiene como objetivo la utilización de cebadores SSR para la diferenciación y el estudio de diversidad genética entre los cultivares de Seashore paspalum.

II OBJETIVO

2.1 General

Identificación de cultivares en Seashore paspalum (*Paspalum vaginatum* O. Swartz) y evaluación de la relación genética usando cebadores de secuencias simples repetidas (SSRs)

2.2 Específicos

Evaluación de treinta y cuatro pares de cebadores SSR en la identificación de 8 cultivares de Seashore paspalum.

Determinación de la diversidad genética con bases a los valores y coeficiente de disimilitud entre y dentro los 8 cultivares de Seashore paspalum.

Elaboración de una tabla de huella molecular usando los marcadores SSR polimórficos y útiles en la diferenciación de los cultivares de Seashore paspalum.

IV. REVISION DE LITERATURA

4.1 Generalidades

4.1.1 Centros de Origen

Algunos botánicos consideran *P. vaginatum* proviene de Asia, África, y Europa (Judd 1979), mientras que otros consideran que es nativo del nuevo mundo e introducido y naturalizado en el viejo mundo.

4.1.2 Zona de adaptación

Paspalum vaginatum es un césped del litoral, de climas cálidos encontrado normalmente entre la latitud 30-35 N-S cerca del nivel del mar de la regiones tropicales y subtropicales de temperaturas cálidas (Morton 1973; Skerman y Riveros 1990). Las especies son considerada halófila y masofila (webster 1987). Esta hierba hidrófila se adapta a ambientes acuáticos, semiacuáticos y húmedos (Skerman y Riveros 1990). La hierba tolera condiciones de encharcamiento e inundaciones, mesohalina periódica en los pantanos de sal, y las zonas costeras de marea. (Wilson 1960). Es útil para el control de la erosión en terrenos con presencia de salinidad y áreas sometidas por mareas (Skerman y Riveros 1990).

4.1.3 Dispersión

Paspalum vaginatum ha sido vegetativamente transportado alrededor del mundo por dos diferentes razones: Primero, el césped fue usado como camas en la parte inferior de los barcos de esclavos al moverse entre África, Norte América, Sur América, América Central y las Islas del Caribe. Esto explicaría el descubrimiento de diversos eco tipos de *Paspalum* en las áreas claves de desembarque de los esclavos a lo largo de Georgia (Sea Island, Ft. Pulaski) y costas Carolina del Sur (Sullivan Island) (Gray 1933) pero no universalmente en todo el Este de las sedes costeras de Estados Unidos y sólo en determinadas islas del Caribe, donde los barcos pasaron a ser acoplados. *Paspalum* Sea Island, Establecida en Georgia fue introducido en Hawái en la década de 1980 por Walter Nagorski. Fue plantado en el Club Internacional de Honolulu, en Oahu País y, finalmente, en el Mauna Lani Resort en la Isla Grande de Hawái (Kona) (Morey 1994)

4.1.4 Clasificación Taxonómica

Familia	Gramineae (Poaceae)
Subfamilia	Panicoideae
Supertribu	Panicodae
Tribu	Paniceae
Subtribu	Setariinae
Genero	<i>Paspalum</i>
Grupo	Disticha
Especie	<i>vaginatum</i>
Autoridad	Swartz

4.1.5 Características

Planta herbácea anual, de tallos ramosos, dicótomos que alcanzan de 40 a 50 cm. Hojas sésiles opuestas, rudimentarias, enteras, superpuestas unas sobre otras y de matiz verde oscuro (Contreras y Carranza 2008). Vainas, con aurículas pequeñas, lígula membranosa, 0,5 mm de largo, con un anillo de tricomas blancos suaves detrás de él, los tricomas a veces hasta 5 mm de largo; hojas generalmente rígidas, ascendiendo en un ángulo uniforme, 2.5-15 cm de largo, 3-8 mm de ancho en la base, más estrecho que la cumbre de la vaina, el ápice atenuado (Wagner *et al.* 1999). Sus flores imperceptibles a la vista, están reunidas en grupitos axilares. Florece entre verano y otoño dando lugar a un fruto capsular bulboso e indehiscente. (Contreras y Carranza 2008)

Es generalmente propagado vegetativamente mediante espigas o estolones porque la producción de semilla no ha sido fiable llegando a auto compatible en este asunto (Dunca y carrow 2000). Debido a la textura áspera es a menudo uno de los céspedes de la temporada de verano en pasar a estado de latencia; generalmente requiere consecutivos días con temperaturas por debajo de la congelación para llegar a su total dormancia. Generalmente el eco-tipo de textura fina de *Paspalum* se establece mejor que el tipo de textura gruesa, debido al mayor volumen de nudos (rango de nudos de aproximadamente 13:5) (Webster 1987).

4.1.6 Número de cromosoma/Citología

El género *paspalum* contiene 320 especies (Watson y Dallwitz 1992), 330 (Clayton y Renvoize 1986), o 400 especies (Chase 1951). Aproximadamente 220 especies pueden ser encontradas prácticamente en todas las comunidades de herbarios dentro de varios ecosistemas en Brasil (Valls 1987). Un número considerable de especies de *paspalum* se caracterizan por una raza apodíctica, autotetraploide y una raza diploide con reproducción sexual auto-incompatibles (Quarin 1992). Fenotípicamente, biotipos de la misma especie tetraploides y diploides normalmente no se diferencian y por lo general forman poblaciones

simpátricas en América del Sur (Norrman *et al.* 1989). Los diploides ofrecen la variabilidad genética durante la evolución de tetraploides apodícticos de la especie *Paspalum*. El *Paspalum* diploide es generalmente auto-incompatible y no apomíctico (Bovo *et al.* 1988). El número de cromosoma para la mayoría de *Paspalum* es $x=10$ (Pitman *et al.* 1987 y Bovo *et al.* 1988).

Paspalum vaginatum es una especie diploide con reproducción sexual con algunas auto-esterilidades y una propensión a la polinización cruzada entre clones de diferente orígenes (Carpenter 1958). El número de cromosomas para *P. Vaginatum* O. Swart es $2n=2x=20$ (Fedorov 1974; Okoli 1982; Quarín y Brusón 1983; Ilaurado 1984; Clausen 1993). Pero tipos tetraploides ($2n = 4x = 40$) y hexaploides ($2n = 6x = 60$) han sido reportados (Love 1976).

Información de la diversidad genética entre los cultivares adaptados o materiales de reproducción seleccionados tiene un impacto importante en el mejoramiento de los cultivos. Se puede adquirir a partir del análisis de pedigrí, los caracteres morfológicos o utilizando marcadores moleculares (Pejić *et al.* 1998). Este conocimiento es útil en el manejo de banco de genes y experimentos de cultivos como el etiquetado de germoplasma, identificación y exclusión de duplicados en las acciones de genes y la creación de la colección de núcleos. Otra aplicación del conocimiento de la diversidad genética es la clasificación de las poblaciones para la cartografía del genoma (Kaga *et al.* 1996 y Nisar *et al.* 2007).

La diversidad genética entre y dentro de las poblaciones de plantas resulta de una combinación de lejanía física, el tamaño de la población, el tipo de sistema de apareamiento (autofecundación o fecundación cruzada), el modo de dispersión de semilla y polen, y la velocidad de flujo de genes (Loveless y Hamrick 1984; Mekuria *et al.* 2002). Las nuevas mejoras en la biología molecular han hecho genotipados de ADN de las plantas viables y un número de técnicas están disponibles hoy en día para caracterizar polimorfismo de

ADN. Bastantes de estas técnicas se han utilizado en estudios filogenéticos, análisis de la diversidad genética y la caracterización de variedades de plantas (Williams *et al.* 2004)

4.2 Necesidades de caracterización

Identificación exacta y rápida de los cultivares es particularmente importante en propagación vegetativa de plantas por finalidad de obtención de práctica, así como para la protección de los derechos de propiedad (Nicese *et al.* 1998). La identificación varietal es también importante para la documentación de los recursos genéticos y la protección de los beneficios de ganaderos (Selbach y Cavalli-Molina 2000). La evaluación de la diversidad genética para reconocer grupos con genotipos similares es muy importante para conservar, evaluar y utilizar los recursos genéticos, para el estudio de la diversidad del germoplasma como base potencial de genes que pueden ser capaces de mejorar el rendimiento de cultivos, y para determinar la distancia y singularidad de la formación fenotípica y genética de genotipos con el fin de proteger los derechos de propiedad intelectual de los obtentores (Subudhi *et al.* 2002; Nemera *et al.* 2006). Estudios de diversidad también sería deseable con el fin de mejorar la gestión y conservación de los recursos genéticos y para la planificación de las estrategias de reproducción (Badenes *et al.* 2000).

4.3 Los métodos tradicionales de caracterización

Convencionalmente, la diversidad genética se ha evaluado sobre la base de la disimilitud en caracteres morfológicos y agronómicos o ascendencia en la información para los diferentes cultivos (Sneller *et al.* 1997; Bernard *et al.* 1998; Liu *et al.* 2004.) Antes del progreso en el campo de la Biotecnología, solo las características morfológicas y físicas fueran tomadas en consideración, para la caracterización de diferentes variedades.

4.4 Limitaciones de los métodos tradicionales

Aunque el enfoque taxonómico convencional se ha ejercido tradicionalmente para la identificación de cultivares y puede dar una identificación única de las variedades cultivadas, no es bien apropiado para proporcionar identificaciones fiables juiciosas. No es posible averiguar completamente el genoma por descripción morfológica (Nandini y Chikkadevaiah 2005). Aunque la selección del material para el mejoramiento basado en la caracterización morfológica ha sido un método eficaz, las comparaciones morfológicas pueden tener ciertas limitaciones, incluyendo influencia del medio ambiente o prácticas de manejo (Gepts 1993; Nemera *et al.* 2006.). Es por lo tanto, difícil de distinguir los genotipos solo sobre la base de su morfología externa. Además, estos caracteres fenotípicos son normalmente influenciada no solo por los factores medioambientales, sino también por la etapa de crecimiento de la planta (Baranek *et al.* 2006).

4.5 Marcadores Moleculares

Sin embargo, el bajo número de estos marcadores y la posibilidad de interferencia estática o ambiental limitan su uso. El número de marcadores genéticos disponibles fue ampliado. La aplicación de la técnica se expandió prácticamente a todas las especies de organismos, (Ferreira y Grattapaglia 1998). Un marcador molecular es cualquier fenotipo molecular oriundo de la expresión de un gen o de segmentos específicos de ADN, que puede ser detectado y su herencia monitoreada. Un marcador molecular recibe el nombre de marcador genético cuando su comportamiento se rige de acuerdo con las leyes básicas de la herencia mendeliana, (Yañez 2002).

Una de las ventajas de la utilización de los marcadores moleculares es la identificación y distinción de y variedades, líneas puras e híbridos y así proteger los derechos de obtener variedades vegetales protegidas. Esto permite una distinción más precisa de genotipos que los ‘descriptores’ morfológicos. Sin embargo, los marcadores moleculares no han sido

adaptados por los organismos oficiales encargados de la protección de variedades (Moreno 2002)

4.5.1 Microsatélite o secuencias simples repetidas (SSR)

Los microsatélite o secuencias simples repetidas (SSR) son regiones de secuencias pequeñas (dos a 10 pares de bases) repetidas, arregladas en series, las cuales se asume que están distribuidas azarosamente por todo el ADN. Son secuencias de ADN altamente variables dispersas a través de los genomas de hongos, plantas y animales, los cuales pueden o no estar asociadas con genes, son loci altamente mutables que pueden estar presentes en muchos sitios del genoma. Dado que, la repetición por sí misma no codifica para formar ninguna proteína, y debido a que las secuencias de ADN repetitivo pueden recombinarse y expandirse más frecuentemente que otros tipos de secuencias, estas regiones son a menudo altamente variables y consecuentemente útiles para medir el polimorfismo entre especies o variedades muy relacionadas (Phillips *et al.* 1995; Valadez y Kahl 2000).

4.5.2 Marcadores SSR en contraste con otros marcadores

Las Isoenzimas son proteínas que pueden variar en la expresión en diferentes condiciones ambientales. Fallan también para discriminar genotipos estrechamente relacionados debido a la falta de polimorfismo (Phillip y McClean 1998).

RFLPs son marcadores basados en la hibridación que las hacen mucho tiempo, laboriosa y más técnicamente exigente de PCR basados en marcadores (Gupta *et al.* 1990). Mientras RAPDs son marcadores basados en la PCR, y proporcionan un amplio polimorfismo, su consistencia y repetitividad son cuestionables. (Devos y Gale 1992; Gupta *et al.* 1999). Además, RAPDs han sido reportados como informativos o ineficientes para estudios de diversidad genética (Mueller; Wolfenbarger 1999; Gallego *et al.* 2005; Jeung *et al.* 2005; Yu *et al.* 2005; Behera *et al.* 2008).

AFLP es otro sistema de marcador basado en la PCR, pero requieren más exigente técnicamente habilidades de RAPDs y con frecuencia requieren tinción de plata, auto radiografía o la detección de basada en fluorescencia (Gupta *et al.* 1999).

En las plantas SSRs están siendo utilizadas para evaluar la variabilidad genética de las colecciones de germoplasma para hacer la elección apropiada de los padres para generar poblaciones reproductoras (Kalia *et al.* 2011). SSRs han sido satisfactoriamente usadas para estudios de diversidad genética y polimorfismo en muchas especies incluyendo arroz *Oryza sativa* L. (Olufowote *et al.* 1997) *Zea mays* L. (Lybberstedt *et al.* 1998) y cebada *Hordeum vulgare* L. (Struss; Plieske 1998).

5.6 La aplicación de marcadores SSR para evaluar la diversidad en otros cultivos

Los marcadores SSR se han utilizado con éxito para evaluar la diversidad en muchos cultivos. Algunos de ellos son: estimo la diversidad genética entre los genotipos de cebada 163. Se detectaron un total de 130 alelos con 15 marcadores de micro satélite. El número de alelos por marcador de microsatélite varió de 5 a 15. Fue observado un promedio de 8.6 alelos por locus (Struss *et al.* 1998).

(Narvel *et al.* 2000) evaluaron la diversidad genética a través de los marcadores de repetición de secuencia simple (SSR) en 39 genotipos de soya elite (Elite) y 40 nuevas genotipos de introducciones. Un total de 397 alelos fueron detectados entre los 79 genotipos en 74 loci de marcadores SSR.

(Álvarez *et al.* 2001) utilizaron 17 loci de microsatélite para estudiar la diversidad entre las 31 accesiones de tomate que comprende nueve especies del género *Lycopersicon*. Los polimorfismos de microsatélite fueron utilizados para estimar la distribución de la

diversidad en todo el género para evaluar la eficiencia de los microsatélite para establecer relaciones de especies en comparación con reconstrucciones filogenia existentes.

(Huang *et al.* 2002) utilizó un conjunto de 24 marcadores de microsatélite de trigo, lo que representa al menos un marcador de cada cromosoma, para la evaluación de la diversidad genética de 998 accesiones de trigo harinero hexaploides (*Triticum aestivum* L.) que se originó a partir de 68 países de los cinco continentes. Un total de 470 alelos fueron detectados con un número medio de alelos por locus de 18,1.

IV MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Localización del sitio de estudio

La investigación se realizó entre los meses de junio hasta inicios de septiembre en la Universidad Estatal de Georgia Griffin Campus, Ubicada a una altura de 298 msnm, temperatura media de 26 °C, humedad relativa de 80%, velocidad de viento de 12 km/h cabe recalcar que fueron los meses de verano en el área de Griffin, Georgia.

5.2 Material vegetal

El material vegetal utilizado para la identificación de los cultivares (Tabla 1) son proveniente de la colección que existen en el campus de la Universidad Estatal de Georgia, Griffin, Atlanta, USA.

Tabla 1. Selección de los materiales de césped

Nombre del cultivar	Tipo de césped	Procedencia
Azul	Seashore paspalum	Griffin, GA
Aloha	Seashore paspalum	Griffin, GA
Durban	Seashore paspalum	Griffin, GA
Seadawlf	Seashore paspalum	Griffin, GA
Salam	Seashore paspalum	Griffin, GA
SeaIsle 1	Seashore paspalum	Griffin, GA
SeasIsle2000	Seashore paspalum	Griffin, GA
Supreme	Seashore paspalum	Griffin, GA

5.3 Extracción de ADN

El ADN fue extraído a partir de pequeñas porciones de tejido foliar de 2g colectadas de plantas cultivadas en invernadero.

Se extrajo el ADN utilizando el método CTAB (Doyle y Doyle 1990) con algunas modificaciones. El tejido vegetal fue macerado usando 700µl al 2% de CTAB solución tampón junto con 2 balines de porcelana (MP Biomedicals, OH, USA) utilizando el agitador Restch® MM300 (Haan, German) en una frecuencia de 30/s por 2 minutos. Antes de la maceración, las muestras fueron incubadas a baño maría por 30 min a 65 °C. Después de la extracción, el aislamiento del ADN genómico siguió el protocolo del método CTAB. Luego, la calidad de ADN fue examinada en gel de agarosa al 1%. La concentración de ADN fue cuantificada con el fluorómetro Hoefer DyNA Quant 200 y luego diluida a la concentración alrededor de 50ng/ µl para el siguiente paso del experimento.

5.4 Amplificación de PCR

Para el análisis de ligamiento con el marcador molecular SSR se utilizaron 34 pares de cebadores (Tabla 2).

Tabla 2. Cebadores utilizados y el número de fragmentos polimórficos resultante de cada uno

Cebador	Secuencia	Bandas total
863	CACTTTCCCGGATTCTCGACTACT	4
278	CTCTCGCACAACCCACTACTGTAA	13
7737	TCACACCAAGTGCTACTATGCCAC	24
14427	CTCTTCGCCTCACTACTCTCCTTG	28
2452	CCAAGTCCATATACCCATGGAAAA	27
2083	AGTAGGAGCCCTGTTGTTGGATCT	10
3211	AAAGTATAGCCCGGTGCAAGAAAT	14
988	ACAGATAGAGTCATGCTTCATGCG	23
2848	AAACATTGACTTCAGAGTGGAGGC	17
3743	CTATACTCGCCCTACCTGATCCCT	26
1547	AGTTCAGAAACGAACAACTTTCCG	10
2480	ATACAGCACGCCTCTGATCTCTCT	6
2617	TATTTTGTGACATCGTCGGTGAGT	9
2478	CAGGTTGCCTCACTCAGAAGAACT	10
224	ATGACTACCTCTTCGCCCTTCGTTT	11
6839	GTTGGGAGTTCTGGAATCACTGTC	32
808	TCCATTTCACTACTCTCTCCCTCG	11
3996	AAAGGTTGCCAGAGCTGTAAACTG	24
5400	GGGACTAATAGCCTCCCTTCCC	8
6761	GTTGGCACCAAAATAACAGGAGAT	14
34	CTTAAGTCTCCGCGAAAACACACT	17
372	CTCGACTGCTTCTGCTTCTACTCC	10

^zY = (C o T)

^yR = (A o G)

En la Amplificación de la PCR se utilizó un volumen final de 10 µl que contenía: 3.3 µl de H₂O, 2 µl de ADN genómico (50ng), 2 µl Tampón de PCR (1X), 0.8 de MgCl₂, 0.8 µl dNTPs (10 mM), 0.5 µl de cada cebador (5 uM) y 0.1 µl Taq polimerasa (1U).

El termociclador GeneAmp PCR Systems 9700 (Applied Biosystems), fue programado según la siguiente programación: una desnaturalización inicial de 3 minutos a 94 ° C seguido por 40 ciclos de 40 segundos a 94 ° C, para apareamiento 40 seg a 61° C (Temperatura media de los cebadores), 1 min a 72° C, una extensión final de 10 min a 72° C para finalizar a 4° C infinitamente para conservación.

Una vez finalizada la etapa de amplificación mediante PCR, se prosiguió a la siguiente etapa.

5.5 Separación de fragmento de PCR y análisis de datos

Todos los productos de PCR fue separado en un gel de poliacrilamida al 3% (una mezcla de 7:6 de agarosa MetaPhor [FMC BioProductos] y ADN de grado de agarosa [FisherBiotech]) usando tampón TBE 1X por medio de electroforesis con las siguiente condiciones 1.5 hora a 250 V. Los fragmentos de PCR separados se tiñeron con bromuro de etidio, se visualizaron con luz UV y se usó como referencia ADN escalera de 100 pb (Invitrogen) en el mismo gel para poder predecir el tamaño de los fragmentos.

Una vez obtenida la fotografía del gel, mostrando los resultados finales para cada marcador se prosiguió a la elección de un fragmento estándar. Esto fue útil como punto de referencia para deliberación entre los demás fragmentos. Tomando en cuenta si era suficientemente intensa y diferente en tamaño de las bandas vecinas que se anotó con confianza.

Las bandas más similares a la banda base. Elegida previamente. Fue usada para la construcción de una matriz. Siendo representadas de la siguiente forma. La presencia fue

representada por el “1” y un “0” para la ausencia de banda. Una vez construida la matriz (dato no mostrado). Se prosiguió al análisis de los resultados. El programa computacional personal NTSYS-pc (version 2.0 Rohlf 1993) fue usado para el análisis de la matriz. La matriz de disimilaridad genética entre los cultivares fue calculado utilizando SIMQUAL (la similitud entre datos cualitativos). Luego, el coeficiente de similaridad fue usado para construir un demógrafo usando el UPGMA (Método no ponderado par-grupo de métodos con los promedios aritméticos) a través de la rutina SAHN (agrupamiento secuencial, jerárquica, aglomeración y anidados) del paquete NTSYS-pc.

V RESULTADOS Y DISCUSIONES

5.1 Caracterización marcadores SSR

A partir de los treinticuatro pares de cebadores evaluados solamente 22 pares proporcionaron (Reacción SSR típica Figura. 1) resultados altamente informativos y revelaron buena amplificación entre los cultivares examinados. Estos cebadores se encuentran descritos en la Tabla 2. De esos veintidós cebadores resultaron un total de 78 alelos polimórficos, identificando de esta manera un rango entre 2 y 8 alelos, proporcionando un promedio de 4.14 alelos por locus en 8 cultivares de *Seashore paspalum* examinados.



Figura 1. SSR patrones de cultivares de *Seashore paspalum* y selecciones producidos por los cebadores 2452, 2083, 3211, 988, 2848 y 3743: (A) Azul, (B) Aloha, (C) Durban, (D) Sea Dawlf, (E) Salam, (F) SI-1, (G) SI-2k, (H) Supreme.

Los 22 loci SSR amplificaron un total de 348 fragmentos de ADN que se utilizaron para el análisis genético. Un fragmento fue juzgado para ser calificable, si era suficientemente intensa y suficientemente diferente en tamaños de las bandas vecinas. Esto fue útil para anotar las bandas con confianza y así homogenizar los resultados.

5.2 La diversidad genética entre los cultivares de Seashore paspalum

Los 348 fragmentos fueron utilizados para calcular el valor de disimilaridad y la estimación de la relación entre los cultivares (Tabla 3). La relación genética entre los cultivares de Seashore paspalum proporcionaron resultados con valores que van de 3.08 y 7.33 de disimilitud. El promedio de los valores en el estudio es de 6.27. Los valores más pequeños indican una relación más estrecha entre los cultivares. La mayor similitud se observó entre los dos cultivares: Salam y Supreme (3.08), mientras que la mayor diferenciación se observó entre: Seadawlf y Azul (7.33).

Tabla 3. Valor de disimilaridad para cada combinación de pares del genotipos de Seashore paspalum basados en marcadores SSR

	Azul	Aloha	Durban	Seadawlf	Salam	SeaIsle1	SeaIsle2	Supreme
Azul	0.00							
Aloha	5.71	0.00						
Durban	6.65	6.57	0.00					
Seadawlf	7.33	5.98	7.03	0.00				
Salam	4.70	4.81	6.41	6.49	0.00			
SeaIsle1	7.03	6.32	6.73	3.24	6.64	0.00		
SI-2k	7.10	6.57	6.16	6.88	6.73	6.73	0.00	
Supreme	4.81	5.13	6.65	6.41	3.08	6.06	6.96	0.00

La matriz de disimilaridad fue usada para generar un demógrafo (Figura 2). Con el demógrafo construido, mediante el análisis UPGMA se pudo observar gráficamente las cercanía genética existente entre los cultivares. Al analizar el demógrafo, se encontró un coeficiente de 31% hasta 61.2% entre los 8 cultivares, dentro de un rango del 0% al 100%. El primer grupo consistió de una agrupación por 4 cultivares, los cuales fueron: Aloha, Azul, Salame y Supreme, encontrándose dentro de este grupo la mayor relación de distancia genética cuantificada dentro de toda la población. Estos cultivares fueron Salam y Supreme, con un coeficiente de similaridad del 31% indicando así, que son completamente diferentes de los otros cultivares dentro del estudio. Por otra parte, el primer grupo estuvo en un coeficiente de 51.5% de disimilaridad.

El grupo 2 está relacionado con el primer grupo. Con una disimilaridad del 65% entre ambos. Por otra parte, dentro del grupo 2 se agruparon únicamente un par de cultivares.

Estos fueron: Seadawlf and SeaIsle. Mostrando 32.3% de coeficiente, este nivel es bastante parecido al nivel que existe entre los cultivares; Salam y Supreme. Esto no significa, que ambos grupos son similares entre sí. En cambio, lo que permite es conocer la existencia de un nivel cuantitativo parecido, pero amplificadas en diferentes puntos en el genoma de ambos pares.

El grupo 3 fue conformado nuevamente por un par de cultivares. Estos fueron: Durban y SeasIsle2000 mostrando la mayor disimilaridad en este estudio. Siendo totalmente diferentes de los demás. Por lo tanto, podrían ser útiles para cruzamiento con los grupos de cultivares menos emparentados entre sí, permitiendo desarrollar nuevos cultivares de Seashore paspalum.

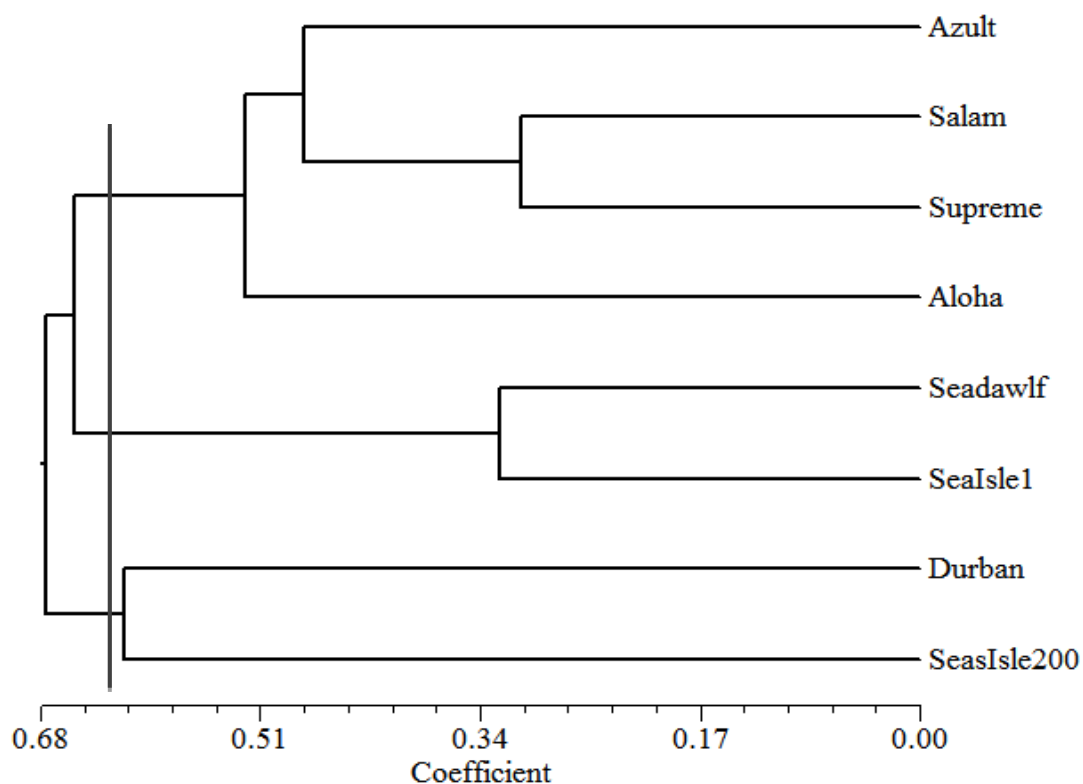


Figura 2. Demógrama representando la relación genética entre 8 cultivares de Seashore paspalum basados en el análisis de clúster NTSYS a partir de los datos obtenidos de los valores de similitud

5.3 Distinción y caracterización entre los cultivares

A partir de los 358 fragmentos amplificados previamente, usados para calcular el coeficiente de variabilidad. Se prosiguió a la elección de los cebadores que permitieron la diferenciación entre los cultivares. Para esto, se seleccionó el mayor número de marcadores polimórficos útiles y raros entre los cultivares de menor distancias genética (similares), lo que distinguiría entre los cultivares en este estudio. Esos marcadores están en listado en el anexo 2, donde se observa como cada cultivar fue anotado por la presencia (+) o ausencia (-) de cada uno de los fragmentos.

Entre los 22 pares de cebadores útiles para medir la distancia genética entre los cultivares, 12 pares de cebadores fueron útiles en la construcción de la tabla de huella molecular de los 8 cultivares del presente estudio. Se observó que para la diferenciación entre los cultivares mayormente emparentados (Salam y Supreme) se puede usar un total de 5 cebadores los cuales son: 2848, 3743, 2480, 808 y 5400. Estos cebadores amplificaron un máximo total de 7 marcadores polimorfismos entre los cultivares. En el anexo 2 la tabla de huella molecular de los restantes cultivares se puede caracterizar usando un mínimo de 2 o 3 cebadores. Esta huella molecular hace la identificación y caracterización muy fácil y oportunamente va ser de gran ayuda como bases de selección durante un programa de cruzamiento.

En contraste con estudios realizado por Zhenbang Chen *et al.*, (2009) diversidad genética entre cultivares de Seashore paspalum a través de marcadores AFLP, donde se encontró que los valores de disimilitud fue de 0% a 49%, en comparación con los resultado obtenido en la investigación realizada donde se encontraron rangos de 30.8% al 68% de disimilitud en 8 cultivares (Figura 2). Esta comparación nos permite afirmar que los marcadores SSR son eficientes para la diferenciación entre cultivares de Seashore paspalum. Esto se comprueba en base a los resultados obtenidos en el estudio realizado, donde se encontró una mayor diferenciación cuantitativa en los cultivares sometidos al estudio con marcadores SSR.

Sin embargo, existen algunas diferencias en las agrupaciones de los cultivares estudiados por Zhenbang Chen *et al.*, (2009) y las agrupación encontradas en este estudio, donde los cultivares Seadawlf y SeaIsle1 forman el grupo 2 y los cultivares Durban y SeasIsle2000 conglomeran el grupo 3, mientras que el estudio con marcadores AFLP estos cultivares son agrupados dentro de un solo grupo con excepción de Durban, en la que se agrupa independientemente por la gran distancia genética que existen entre Durban y los cultivares Seadawlf, SeaIsle1 y SeaIsle2000.

Según Levi y Rowland, (1997) afirman que al utilizar diferentes juegos de cebadores dentro de un mismo estudio, pueden resultar diferencias entre valores de similaridad debido a que cebadores diferentes revelan diferentes partes del genoma al azar.

Esta investigación indica que los cebadores SSR son herramientas útiles en la diferenciación entre los cultivares y podrían ser usados para completar los datos morfológicos y agronómico. La cuales ha sido utilizado por Christine Kubik, *et al.*, (2009), para la protección de variedades vegetales y/o la identificación de variedades y podrían ser útiles en este estudio.

VI CONCLUSIONES

De los 34 pares de cebadores utilizados para la identificación de variabilidad genética en los cultivares en Seashore paspalum, únicamente mostraron bandas polimórficas 22 pares o un 64.70% de los mismos, siendo los más útiles en la identificación genética los siguientes cebadores: 2848, 5400 y 3743, cuales amplificaron bandas raras y útiles para la identificación.

Se determinó que los cultivares con mayor variabilidad genética entre sí fueron: el cultivar Azul y Seadawlf, con un coeficiente de variabilidad de 7.33 y los cultivares con mayor parentesco genético fueron: los cultivares Salam y Supreme con un coeficiente de variabilidad del 3.08.

Tres clúster fueron conformados con los cultivares: el primer clúster fue conformado con los cultivares; Azul, Salam, Supreme y Aloha, el segundo clúster formado por Seadawlf y SeaIsle1, y el último clúster por: Durban Y SeaIsle2000, las agrupaciones se produjeron en base a la similitud genética arrojadas por los cebadores SSR.

Entre los 34 cebadores SSR estudiados, se encontró que 12 de los cebadores fueron útiles para la toma de huella molecular de ADN y facilitan la identificación y caracterización de los 8 cultivares.

Con los marcadores SSR se pudo obtener una huella genética para cada uno de cultivares evaluados, en la que se identificó un máximo de 7 bandas polimórficas entre los cultivares Salam y Supreme, estos marcadores podrían ser útiles en un proceso de certificación de cultivares.

VII. RECOMENDACIONES

Diseñar nuevos cebadores a partir de la bandas polimórficas identificadas en cada cultivar para ser amplificadas y analizar el poder discriminativo con los demás cultivares.

Se deberá realizarse nuevas amplificaciones con los mismos y nuevos cebadores, como medida de validación y asegurarse diferenciación de los cultivares.

VIII. BIBLIOGRAFIA

Ariyaratne, PN; Mewan, KM; Goonetilleke, WA; Attanayake, DP. 2009 Study of Genetic Relationships of Tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) Using SSR makers and Pedigree Analysis. Agricultural Research Symposium 293-298.

Arno, E; Rodríguez, N; *et al.* 2007. Evaluación de la diversidad genética de subespecies de arroz usando marcadores microsatelitales y AFLP. Universidad Central de Venezuela. 10p.

Azofeifa, D. 2006. Uso de marcadores moleculares en plantas; Aplicación en frutales del trópico. Ph. D. Tesis. San Pedro de Montes, Costa Rica. Universidad de Costa Rica. 219-241p.

Boopathi, NM. 2013. Genetic mapping and marker assisted selection. Basics, practice and benefits. Springer New Delhi. Coimbatore, TN, India. 293p.

Brosnan, JT; Deputy, J. 2008. Seashore paspalum.. Department of Tropical of Plant and Soil Sciences. Manoa, USA. Universidad de Hawai. 8p.

Carreras, J. Fundación. En línea. Disponible en http://www.fcarreras.org/es/glosario_1937?gclid=CJKez_KF7qgCFQ_u7QodOhfxTQ

Cornell University, US. 2003. Tecnología de marcadores moleculares para el estudio de diversidad genética de plantas: Módulo de aprendizaje tecnología basadas en el ADN; Tecnología basadas en la PCR (diapositiva). Cornell, US. 38 diapositivas.

Duque, DP. 2009. Protocolo de secuenciación de ADN. 12 pág.

Ferreira, M. Grattapaglia, D. 1998. Introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético. 1 ed. Brasilia: Embrapa-Cenargen. pp220.

González, G. (s.f). Desarrollo de un mapa genético con marcadores AFLP y Rodaballo (*Scophthalmus maximus* L.). Tesis doctoral en la facultad de biología. Santiago de Compostela, España. Universidad de Santiago de Compostela. 225 pág.

Grandón, N; Moreno, V; *et al.*, 2012. Characterization of sunflower inbred lines (*Helianthus annuus* L.) for high oleic acid content using SSR markers. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. (2): 1-7.

IPGRI; Cornell University. 2004. Medidas de diversidad genética. Análisis de diversidad genética utilizando datos de marcadores moleculares. USA. 86 diapositivas.

Jiang, Y.W., R.R. Duncan; R.N. Carrow. 2004. Assessment of low light tolerance of seashore paspalum and bermudagrass. Crop Sci.

Judd, BI. 1979. Handbook of Tropical Forage Grass. Garland STOM Press, New York.

Kubik, C; Honig J; Meyer WA; Bonos, SA. 2009. Genetic diversity of creeping bentgrass cultivars using SSR markers. International Turfgrass Society. (11): 533-547.

Levi, A; Rowland, LJ; 1996. Identifying Blueberry Cultivars and Evaluating Their Genetic Relationships Using Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) and Simple Sequence Repeat- (SSR-) anchored Primers. Journal American Society Science. 122(1): 74-78.

Levitus, G; Echenique, V; Rubinstein, C; Hopp, E; Mroginski, L. 2010. Biotecnología y mejoramiento vegetal. 2 ed. s.l. Editorial Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. 648 pag.

Liu, Z.-W., Jarret, R.L., Duncan, R.R; Kresovich, S. 1994. Genetic relationships and variation of ecotypes of seashore paspalum (*Paspalum vaginatum*) determined by random amplified polymorphic DNA markers. *Genome* 37:1011-1017.

Love, A. 1976. IOPB chromosome number reports. II. *Taxon* 25:155-164

Luján, GT. 2004. Desarrollo de marcadores SCAR y CAPS en un QTL con efecto importante sobre la resistencia al tizón tardío de la papa. Ph. D. Tesis biólogo con mención en genética. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 65p.

Mathias, RM; Sagredo, BD; Kalazich, BJ. 2006. Uso de marcadores moleculares SSR para identificación de germoplasma de papa en el programa de mejoramiento de INIA de Chile. *Agricultura Técnica*. 37:3-15.

Mendoza, MF; Cervera, MT; Cabezas, JA. 2001. Biotecnología vegetal. Utilización de marcadores AFLP y SAMPL en la identificación de especies y variedades de cítricos. No. 1:11-16

Onamu, R; Legaria, JP., *et al.* 2012. Analisis de marcadores morfológicos y moleculares en papa (*Solanum tuberosum* L.). *Fitotecnología Mexico*. No 35:267-277

Paran, I; Michelmore RW. 1993. Development of reliable PCR based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. Ph. D. Tesis. New York, US. Cornell University. 230p.

Pervaiz, Zh; Rabbani, MA; Pearce, SR. 2009 Determination of genetic variability of Asian rice (*Oryza sativa* L.) varieties using microsatellite markers. African Journal of biotechnology. 21(8): 5641- 5651

Ruiz, C. 2002. Desarrollo de marcadores moleculares de aplicación en genómica y programas de mejora de cítricos. Ph. D. Tesis. Valencia, España. Universidad de Valencia. 130p.

Tam W. 2001. Marker Assisted Selection techniques in Plant Breeding. Ph. D. Tesis. Ontario, Canada. University of Guelph. 70p.

Wang, M.L; Chen, Z.B; *et al.* 2004. Characterization of seashore paspalum (*Paspalum vaginatum* Swartz) germplasm by transferred SSRs from wheat, maize and sorghum. Genetic Resources and Crop Evolution. 06(53): 780-791

Winzer, N; Di Renzo, M; Olmos, Sofía. 2004. Biotecnología y Mejoramiento Vegetal. Métodos para estimar variabilidad genética. Eds. V. Echenique; C Rubinstein y L. Mroginski. Buenos Aires, Argentina. 649 p.

Yañez, V. 2002. Aislamiento y caracterización de marcadores moleculares micro satélites a partir de librerías genómicas enriquecidas de camote (*Ipomea batata* (L.)). Lima, Perú. Universidad Nacional Mayor de San Carlos. 108 pág.

ANEXOS

Anexo 1. Protocolo de Extracción de DNA

Colocar 2 balines de porcelana y una pieza de una dimensión de 2cm x 5mm de tejido joven de hoja dentro de un tubo de 2ml.

Alícuota 700 µl de CTAB + 2-mecaptoethanol (20 µl/ml) dentro de un tubo de 2 ml.

Tritura bien con el agitador durante 2 min.

Incubar a 65°C durante 30-60 min.

Añadir 700 µl cloroformo: alcohol isoamil (24:1) y mezclar

Centrifugar a 10000 durante 10 min

Transferir 500 µl del sobrenadante en un nuevo tubo 1.5 ml

Agregar 350µl isopropanol al sobrenadante

Dejar enfriar durante 5 min en hielo

Centrifugar por 10 min a 10000 rpm

Verter el líquido y secar los granulo de ADN

Agregar 300µl H₂O con RNase, para re-suspender completamente

Añadir 900µl 100% EOTH y centrifugar por 1 min a 10000rpm

Lavar con 500µl de Etanol al 80%

Centrifugar por 3 min a 10000 rpm

Secar nuevamente los gránulos de ADN en la centrifuga de vacío

Agregar 100 TE/ox H₂O

Anexo 2. Los marcadores SSR más útiles para distinguir los cultivares de Seashore paspalum expresados de menor a mayor tamaño molecular

Marcadores SSR	Azul	Aloha	Durban	Seadawlf	Salam	SeaIsle 1	SeaIsle2000	Supreme
863 (2)	-	-	-	-	-	+	-	-
7737 (2.1)	-	+	-	+	-	-	-	-
14427 (2.1)	-	+	-	+	+	+	+	+
2083 (1)	-	-	+	-	-	+	+	-
2848 (1)	+	-	-	-	-	-	-	-
(2)	-	+	+	-	+	-	+	+
(2.1)	-	+	-	+	+	-	+	-
(3.1)	-	-	-	-	+	-	-	+
3743 (1)	+	+	-	-	-	-	-	+
(2)	-	+	+	+	+	-	-	-
1547 (2)	-	-	-	-	+	-	-	+
2480 (1)	-	-	-	+	-	+	-	+
(1.1)	-	-	-	-	+	-	+	+
2478 (1.1)	-	-	-	+	-	-	-	-
6839 (2)	-	+	-	+	+	+	+	+
808 (1.1)	+	-	-	-	+	-	-	-
(2.1)	-	-	-	-	-	+	-	-
5400 (1)	-	+	-	+	-	+	+	+
(1.1)	-	-	-	-	-	+	-	+

