



**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES**

**FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA**

**MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**ANÁLISIS DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA MEDIANTE**

**MARCADORES ISSR EN *CALIBRACHOA* SP**

**BIOQ. MARIANA C. PÉREZ DE LA TORRE**

**TESINA PARA OPTAR AL TÍTULO DE: MAGÍSTER EN BIOTECNOLOGÍA**

**2011**



# ANÁLISIS DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA MEDIANTE MARCADORES ISSR EN *CALIBRACHOA SP*

TESINA PRESENTADA POR MARIANA CECILIA PÉREZ DE LA TORRE, PARA OPTAR AL TÍTULO DE MAGÍSTER EN BIOTECNOLOGÍA DE LA FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA DE LA UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES.

BIOQ. MARIANA C. PÉREZ DE LA TORRE

DIRECTORA: DRA. RUTH HEINZ

CO-DIRECTOR: DR. ALEJANDRO ESCANDÓN

Este trabajo de investigación se desarrolló con el aporte de subsidios otorgados por el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA).

---

## AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Ruth Heinz, mi Directora y al Dr. Alejandro Escandón, mi co-Director; por darme la posibilidad de crecer profesionalmente, por confiar en mí, por sus calidades profesionales y humanas y por estar ahí cuando los necesité. Sin sus apoyos constantes, este trabajo no hubiera sido posible.

A la Ing. Agr. MSc. Laura Bullrich, la directora del IF, por confiar en mí.

A la Dra. Gabriela Facciuto, por permitirme terminar con este tema.

A la Ing. Agr. MSc. Noga Zelener, por ser mi “maestra” con los ISSR y el NTSyS.

A la Dra. Silvina Soto, por su preocupación y aliento constantes.

A las Dras. Daniela Tosto y Verónica Lía, por sus consejos en los análisis.

A Juan Carlos y Julián, por ser mis referentes con las plantas y por estar ahí cada vez que tenía una duda.

A Adriana y Marce, por aguantar mis cambiantes estados de ánimo.

A Lore y Noe, “mis chicas” en el laboratorio, por su compañía y amistad.

A Pato, Mari y Pau por su compañía y sus palabras de aliento.

A Gonzalo y Nené, por estar siempre dándome una mano con los papeles administrativos.

A Cristian Tomasi, por la mano que me dio en el uso de Arlequín.

---

## DEDICATORIA

A Diego, mi marido, por su apoyo constante y por ser mi pilar fundamental.

A Agus, mi hija, lo más maravilloso que tenemos en esta vida con Diego.

A mis viejos, por estar siempre cuando los necesito.

A mi abuelo Jesús por estar mi lado cuando me hizo falta.

# ÍNDICE DE CONTENIDO

<b>Índice de Figuras</b> .....	<b>6</b>
<b>Índice de Tablas</b> .....	<b>6</b>
<b>Resumen</b> .....	<b>8</b>
<b>Abreviaturas</b> .....	<b>10</b>
<b>1. Introducción</b> .....	<b>14</b>
<b>1.1. Situación de la Floricultura</b> .....	<b>14</b>
1.1.1. Floricultura en el mundo .....	14
1.1.2. Floricultura en la Argentina .....	14
1.1.3. Perspectivas futuras .....	15
<b>1.2. Calibrachoa Cerv. (ex La Llave &amp; Lexarza)</b> .....	<b>16</b>
1.2.1. Características generales .....	16
1.2.2. <i>Calibrachoa</i> como género ornamental .....	17
1.2.3. Zona de distribución .....	18
<b>1.3. Análisis genético de la población</b> .....	<b>21</b>
1.3.1. Diversidad Genética .....	21
1.3.1.1. Métodos para estimar la diversidad genética .....	21
1.3.1.2. Cuantificación de la diversidad genética .....	22
1.3.1.3. Análisis de Agrupamiento .....	25
1.3.1.4. Coeficientes de Asociación y Distancia .....	25
1.3.1.5. Coeficientes de similitud para variables cualitativas de tipo doble estado .....	26
1.3.2. Métodos para el Análisis de Agrupamiento .....	27
1.3.2.1. Algoritmos de clasificación .....	28
1.3.2.2. Medida de la distorsión del fenograma .....	29
<b>1.4. Marcadores Genéticos</b> .....	<b>29</b>
1.4.1. Propiedades de los marcadores moleculares .....	30
1.4.2. Aplicaciones de los marcadores moleculares .....	30
1.4.3. Propiedades más deseables para un marcador molecular .....	31
1.4.4. Interpretación genética .....	33
1.4.5. Marcadores Moleculares basados en la amplificación semiarbitraria del ADN – ISSR.....	34
1.4.6. Marcadores Moleculares en Floricultura .....	39
1.4.6.1. Utilización de los Marcadores en la mejora vegetal .....	39
1.4.6.2. Aplicación de los Marcadores Moleculares en estudios de diversidad genética	40

<b>2.</b>	<b>Objetivo general.....</b>	<b>43</b>
<b>2.1.</b>	<b>Objetivos particulares.....</b>	<b>43</b>
<b>3.</b>	<b>Hipótesis de trabajo .....</b>	<b>43</b>
<b>4.</b>	<b>Materiales y Métodos.....</b>	<b>44</b>
<b>4.1.</b>	<b>Material vegetal.....</b>	<b>44</b>
4.1.1.	Análisis preliminar de las especies nativas del género <i>Calibrachoa</i> mediante ISSR.....	44
4.1.2.	Colección de <i>C. caesia</i> .....	45
<b>4.2.</b>	<b>Extracción, purificación y cuantificación de ADN .....</b>	<b>47</b>
<b>4.3.</b>	<b>Amplificación del ADN .....</b>	<b>48</b>
4.3.1.	Ajuste de las condiciones de reacción .....	49
4.3.2.	Condiciones de reacción .....	49
<b>4.4.</b>	<b>Análisis de los datos moleculares .....</b>	<b>50</b>
<b>4.5.</b>	<b>Análisis de los estadísticos .....</b>	<b>51</b>
<b>5.</b>	<b>Resultados.....</b>	<b>52</b>
<b>5.1.</b>	<b>Extracción de ADN .....</b>	<b>52</b>
<b>5.2.</b>	<b>Condiciones de PCR .....</b>	<b>52</b>
<b>5.3.</b>	<b>Análisis preliminar de las especies nativas del género <i>Calibrachoa</i> mediante ISSR .....</b>	<b>54</b>
<b>5.4.</b>	<b>Colección de <i>C. caesia</i> .....</b>	<b>58</b>
5.4.1.	Perfiles de amplificación .....	58
5.4.2.	Análisis de datos moleculares .....	61
5.4.3.	Análisis de los estadísticos .....	64
5.4.4.	Estructura y variación poblacional .....	67
<b>6.</b>	<b>Discusión .....</b>	<b>73</b>
<b>7.</b>	<b>Conclusiones generales y Perspectivas .....</b>	<b>81</b>
	<b>Anexos.....</b>	<b>82</b>
	<b>Anexo I: Ubicación geográfica de las especies nativas del género <i>Calibrachoa</i> .....</b>	<b>82</b>
	<b>Anexo II: Niveles de unión de las especies nativas del género <i>Calibrachoa</i> .....</b>	<b>84</b>
	<b>Anexo III: Tablas de locus totales y matrices de similitud .....</b>	<b>86</b>
	<b>Anexo IV: Reactivos .....</b>	<b>99</b>
	Protocolo de extracción de ADN de muestras liofilizadas .....	100

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Diagrama ISSR. Modificado de Pradeep Reddy, 2002. _____	35
<b>Figura 2:</b> Estrategia de PCR con iniciadores ISSR. Modificado de Weising et al., 2005. _____	37
<b>Figura 3:</b> Ubicación geográfica de los individuos de <i>C. caesia</i> analizados. Provincia de Misiones, Argentina. ___	47
<b>Figura 4:</b> Esquema del programa utilizado en el termociclador My Cyclor de BioRad. _____	50
<b>Figura 5:</b> Corrida electroforética del ADN extraído de 12 individuos de <i>Calibrachoa</i> . _____	52
<b>Figura 6:</b> Evaluación de las temperaturas de hibridación óptimas. _____	53
<b>Figura 7:</b> Perfil de amplificación de los individuos <i>Calibrachoa</i> con el iniciador 3'GA. _____	54
<b>Figura 8:</b> Perfil de amplificación de los individuos <i>Calibrachoa</i> con los iniciadores 3'GGG, 3'GA y 3'TG. _____	55
<b>Figura 9:</b> Dendrograma obtenido de las especies de <i>Calibrachoa</i> _____	56
<b>Figura 10 a y b:</b> Perfil de amplificación de los individuos de <i>C. caesia</i> con el iniciador 3'AC. _____	58
<b>Figura 11 a y b:</b> Perfil de amplificación de los individuos de <i>C. caesia</i> con el iniciador 5'CA. _____	59
<b>Figura 12 a y b:</b> Perfil de amplificación de los individuos de <i>C. caesia</i> con el iniciador 5'GT. _____	60
<b>Figura 13:</b> Gráfico de correlación cofenética. _____	62
<b>Figura 14:</b> Dendrograma obtenido de los 35 individuos de la colección de <i>C. caesia</i> estudiada. _____	63
<b>Figura 15:</b> Gráfico del patrón de bandas obtenido de la población total de <i>C. caesia</i> . _____	66
<b>Figura 16:</b> Gráfico de coordenadas principales 2 vs 3 de la colección de <i>C. caesia</i> . _____	67
<b>Figura 17:</b> Patrones de bandas totales de los datos binarios obtenidos de la población de <i>C. caesia</i> _____	70
<b>Figura 18:</b> Gráfico de coordenadas principales 1 vs 3 de las poblaciones de Guaraní, Oberá y San Ignacio. ___	71
<b>Figura 19:</b> Gráfico de los porcentajes de la Varianza Molecular. _____	72
<b>Figura 20:</b> Ubicación de los individuos de <i>Calibrachoa</i> en la provincia de Buenos Aires. _____	82
<b>Figura 21:</b> Ubicación de los individuos de <i>Calibrachoa</i> en la provincia de Corrientes. _____	83
<b>Figura 22:</b> Ubicación de los individuos de <i>Calibrachoa</i> en la provincia de Misiones. _____	83
<b>Figura 23:</b> Ubicación de los individuos de <i>Calibrachoa</i> en la provincia de Entre Ríos. _____	84

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1:</b> Especies nativas del género <i>Calibrachoa</i> . Adaptado de Flora del Conosur. _____	20
<b>Tabla 2:</b> Comparación de las propiedades de los marcadores morfológicos vs los marcadores moleculares. ___	33
<b>Tabla 3:</b> Comparación de las características principales de las técnicas moleculares para identificar diversidad genética. _____	38
<b>Tabla 4:</b> Distribución geográfica de las especies de <i>Calibrachoa</i> analizadas. _____	45
<b>Tabla 5:</b> Distribución geográfica de los 35 individuos de <i>C. caesia</i> analizados. _____	46
<b>Tabla 6:</b> Iniciadores ISSR utilizados en las reacciones de PCR. _____	49
<b>Tabla 7:</b> Componentes de la mezcla de reacción. _____	49
<b>Tabla 8:</b> Temperaturas de hibridación óptimas para los iniciadores estudiados. _____	53

<b>Tabla 9:</b> Niveles de unión del dendrograma obtenido de los individuos de <i>C. caesia</i> . _____	62
<b>Tabla 10:</b> Resultados de los estimadores de diversidad genética de los individuos de <i>Calibrachoa</i> . _____	64
<b>Tabla 11:</b> Patrón de bandas de la población total de <i>C. caesia</i> . _____	65
<b>Tabla 12:</b> Promedio de bandas polimórficas según motivos de repetición y su valor de significación. _____	66
<b>Tabla 13:</b> Número y porcentaje de loci polimórficos en cada uno de los departamentos. _____	68
<b>Tabla 14:</b> Promedio y SE en cada loci por cada departamento. _____	68
<b>Tabla 15:</b> Promedio general y SE sobre loci en las 3 regiones. _____	68
<b>Tabla 16:</b> Patrón de bandas obtenidos de los datos binarios. _____	69
<b>Tabla 17:</b> Resumen de los datos obtenidos del análisis de la varianza molecular (AMOVA). _____	71
<b>Tabla 18:</b> Niveles de unión del fenograma de las especies de <i>Calibrachoa</i> . _____	85
<b>Tabla 19:</b> Locus totales de los individuos de <i>C. caesia</i> analizados. _____	95
<b>Tabla 20:</b> Matriz de similitud de los individuos de la colección de <i>C. caesia</i> , según el coeficiente de SM. _____	97
<b>Tabla 21:</b> Matriz de similitud de las especies de <i>Calibrachoa</i> , según el coeficiente de SM. _____	98

---

## RESUMEN

El género *Calibrachoa*, de considerable importancia como cultivo ornamental, debido a la variabilidad y vistosidad de sus flores, pertenece a la familia *Solanaceae*. Históricamente, las especies de *Calibrachoa* eran incluidas en el género *Petunia*, hasta 1985 cuando Wijsman y de Jong reconocen la existencia de los 2 géneros diferentes. En Argentina se encuentran 13 especies nativas, su centro de distribución se halla en la mesopotamia, excepto, *C. parviflora* que está distribuida en gran parte del país. Dentro del marco del proyecto Proyecto Nacional de Hortalizas, Flores y Aromáticas (PNHFA) 65531 de INTA se está trabajando en el mejoramiento de estas especies a fin de obtener variedades (inter e intraespecíficas) competitivas en el mercado florícola. Por lo tanto, el conocimiento de la base genética disponible, generado por los marcadores moleculares, resulta una valiosa herramienta a fin de lograr dichos objetivos. En el presente trabajo se pusieron a punto 13 iniciadores ISSR con las 13 especies nativas del género con el propósito de contar con los protocolos optimizados para el análisis por especie. Se analizaron, además, 35 individuos de una colección de *Calibrachoa caesia* del Instituto de Floricultura, pertenecientes a 5 departamentos de la provincia de Misiones. La extracción y purificación del ADN total se llevó a cabo siguiendo el método de CTAB modificado. Las reacciones de amplificación generaron un total de 701 *loci*, 98% polimórficos, con un promedio de aproximadamente 54 *loci* por iniciador. Los porcentajes de polimorfismo variaron del 100% para los iniciadores 5'GA, 5'CA, 3'TC, 3'CAC y 3'TG, hasta un 91,11% para 3'AC. Los valores máximos de Resolving power (Rp) (23,20 y 22,34) fueron para los iniciadores 5'GACA y 5'GA, respectivamente, mientras que los menores se encontraron en los iniciadores 3'AG (10,29) y 3'TG (10,51). Los mayores valores promedio de los índices de Shannon y diversidad genética (0,367 y 0,231, respectivamente) fueron para el iniciador 5'CT y los menores (0,196 y 0,105) para 3'TG, mientras que el Marker Index osciló entre 11,70 para los iniciadores 5'GACA y 3'GGG y 5,87 para 3'TG. En resumen, los iniciadores más informativos, con un 100% de polimorfismo resultaron ser 5'GACA, 5'GA, 5'CA y 5'CT, y los anclados en 3': 3'CAC, 3'TC y 3'TG, mientras que los menos informativos fueron 3'AC y 3'CAG, con porcentajes de polimorfismo menores al 95%. El dendrograma generado mediante la aplicación del coeficiente de similitud Simple Matching (SM) y el agrupamiento UPGMA revela una alta similitud entre todos los individuos analizados (0,7665). Se llevó a cabo, además, un análisis de la estructura y variación de las poblaciones de Oberá, Guaraní y San Ignacio. Los resultados de los estadísticos calculados muestran la misma tendencia que para la colección total. El análisis molecular de la varianza mostró que la mayor variación genética (93,59%) ocurre dentro de las poblaciones, mientras



que la varianza entre las 3 poblaciones analizadas fue del 6,41%, el índice de fijación ( $F_{st}$ ) obtenido fue del 0,06409, indicando que existe una diferenciación media-baja entre las poblaciones. Los resultados obtenidos reflejan la alta sensibilidad de los marcadores ISSR, que permitieron caracterizar molecularmente a todos y cada uno de los individuos analizados, además de agruparlos por especie, abriendo una perspectiva muy promisorio para la utilización de datos moleculares en la identificación varietal para su aplicación a programas de mejoramiento llevados a cabo en el Instituto.

---

## ABREVIATURAS

A:	Adenina
ADN:	Ácido desoxirribonucleico
AFLP:	Amplified Fragment Length Polymorphism
AMOVA:	Análisis molecular de la varianza
AMP-PCR:	Anchored microsatellite-primed PCR
aprox.:	Aproximadamente
BrEt:	Bromuro de Etidio
C:	Citocina
°C:	Grado centígrado
CABA:	Ciudad Autónoma de Buenos Aires
cc:	Concentración
CNIA:	Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias
com. Per.:	Comunicación personal
cpDNA:	ADN de cloroplasto
c.s.p.:	Cantidad suficiente para
CTAB:	Bromuro de cetil-trimetil amonio
(d):	Destilada
dNTP:	Deoxinucleótidos
DUS:	Distinguibilidad, Uniformidad, Estabilidad
EDTA:	Ácido etilendiamintetraacético
<i>et al.</i> :	Y otros
etc.:	Etcétera
Fst:	Coefficiente de fijación
G:	Guanina
g:	Gramos
gral.:	General

H':	Índice de Shannon
Hs:	Horas
i.e.	Id est = esto es
IF:	Instituto de Floricultura, CNIA-INTA
INTA:	Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria
ISSR:	Inter Simple Sequence Repeat – microsatélites anclados
Km:	Kilómetro
LM:	<i>Loci</i> monomórficos
LP:	<i>Loci</i> polimórficos
LT:	<i>Loci</i> totales
M:	Molar
M:	Marcador de peso molecular
MAS:	Selección Asistida por Marcadores
mg:	Miligramo
MgCl <sub>2</sub> :	Cloruro de Magnesio
MI:	Marker Index
min:	Minutos
mL:	Mililitro
mM:	Milimolar
MP-PCR:	Microsatellite-primed PCR
msm:	Metros sobre el nivel del mar
N:	Número de individuos
Nº:	Número
NaCl:	Cloruro de Sodio
ng:	Nanogramos
O.N.	Over Night = toda la noche
OTU:	Operational Taxonomic Unit = unidad operativa taxonómica
%P:	Porcentaje de polimorfismo
pb:	Pares de bases

PCoA:	Análisis de Coordenadas Principales
PCR:	Polymerase Chain Reaction = Reacción en Cadena de la Polimerasa
PIC:	Diversidad genética o contenido de información polimórfica
PNHFA:	Proyecto Nacional de Hortalizas, Flores y Aromáticas
p/v:	Peso en volumen
PVP:	Polivinil pirrolidona
QTL:	Quantitative Trait <i>Loci</i>
r:	Coeficiente de correlación cofenética
RAPD:	Random Amplified Polymorphic DNA
RFLP:	Restriction Fragment Length Polymorphisms
Rp:	Resolving Power = poder de resolución
RPM:	Revoluciones por Minuto
S:	Sur
SE:	Error estándar
seg:	Segundos
SM:	Simple Matching = concordancia simple
SNP:	Single Nucleotide Polimorfism
sp:	Especie
SPAR:	Single Primer Amplification Reactions
SSR:	Simple Sequence Repeat = microsatélites
STS:	Sequence Tagged Sites
T:	Timina
T°:	Temperatura
TAE:	Tris-Ácido Acético-EDTA
TE:	Tris-EDTA
TRIS:	Tris(hidroximetil)aminometano
U:	Unidades
u.p.:	Ultra pura
UBC:	Universidad de la Columbia Británica, Canadá

Uhe:	Unbiased Expected Heterozygosity = heterocigosidad esperada imparcial
UPGMA:	Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean = método de agrupamiento de pares no ponderados empleando la media aritmética
UPOV:	Unión Internacional para la Protección de las Obtenciones Vegetales
V:	Volts
var.:	Variedad
vs:	Versus
v/v:	Volumen en volumen
W:	Oeste
+	Control positivo
$\lambda$ :	Lambda
$\mu\text{g}$ :	Microgramo
$\mu\text{L}$ :	Microlitro

---

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. SITUACIÓN DE LA FLORICULTURA

La floricultura es una disciplina de la horticultura orientada al cultivo de flores y plantas ornamentales y, por lo general, de uso decorativo. Esta actividad se fue alejando de lo artesanal para ir alcanzando procesos típicamente industriales y de tecnología aplicada. Prueba de ello es que mediante tecnologías apropiadas, se pueden cambiar los momentos de floración (Galantini *et al.*, 2008), determinar la dormición, la maduración del fruto y la influencia de las hormonas vegetales y otras sustancias que regulan el desarrollo de la planta (Hess, 1987).

### 1.1.1. FLORICULTURA EN EL MUNDO

La relevancia económica de la floricultura a nivel mundial es notable, la producción de plantas ornamentales está en constante crecimiento, con actividades comerciales que llegan a unos 35.000 millones de dólares anuales (INTeA, 2003). Se considera que la producción comercial de plantas ornamentales está ascendiendo en todo el mundo, este hecho se ve reflejado por la tasa de crecimiento positiva que subió al 32% en el período comprendido entre 1998 y 2003, siendo además, un sector cada vez más exigente en cuanto a incorporación de nuevas variedades y altos estándares de calidad (INTeA, 2003).

### 1.1.2. FLORICULTURA EN LA ARGENTINA

Desde hace años la Argentina ha contribuido en forma activa al desarrollo del mercado mundial de ornamentales, lo hizo por medio de la incorporación de germoplasma ornamental nativo a los programas de mejoramiento de empresas europeas, asiáticas y estadounidenses. Prueba de esto son las numerosas especies que se pueden encontrar en los catálogos internacionales, a saber: *Alstroemeria sp*, *Verbena sp*, *Calceolaria sp*, *Petunia sp*, *Portulaca sp*, *Primula sp*, entre otras (Sakata Seed Corporation, PanAmerican Seed, Suntory Flowers, Fleuroselect).

Es importante destacar que en nuestro país, con la puesta en marcha del proyecto INTA-JICA “Desarrollo de la floricultura en la Argentina”, se ha comenzado a trabajar en el mejoramiento de plantas nativas con potencial ornamental. Desde entonces se ha caracterizado la aptitud ornamental de diferentes géneros y especies, híbridos, además de variedades mejoradas, como ser: *Bacopa monnieri* (Escandón *et al.*, 2006), *Calibrachoa* (Bologna, *et al.*, 2009, Facciuto, *et al.*, 2006),

*Glandularia* (Imhof *et al.*, 2009), *Gloxinia gymnostoma* (Mata *et al.*, 2007), *Jacaranda* (Soto *et al.*, 2006, Mata *et al.*, 2003), *Mecardonia* (Alderete *et al.* 2006; Escandón *et al.*, 2007, Greppi, *et al.*, 2009), *Nierembergia* (Soto *et al.*, 2009, Facciuto *et al.*, 2008, Soto *et al.*, 2005), *Passiflora* (Bugallo, *et al.*, 2008, Pannunzio, *et al.*, 2006), *Scoparia montevidensis* (Escandón *et al.*, 2005a), *Handroanthus* (sin=*Tabebuia*) (Facciuto *et al.*, 2009a, 2009b, 2008), *Tecoma* (Kobayashi *et al.*, 2004), etc., pero a pesar de estos pasos sustanciales en el desarrollo de nuevas variedades ornamentales a partir de germoplasma nativo, nuestro país debería potenciar el desarrollo y aplicación de las nuevas tecnologías en el área de mejoramiento de cultivo ornamental por lo que la correcta identificación genética del germoplasma es un factor de creciente importancia dentro de la producción vegetal.

El desarrollo de nuevas variedades, como así también la caracterización de las tradicionales, impulsan el desarrollo de nuevas técnicas que permiten una identificación genética robusta de estos materiales. Las llamadas huellas digitales genéticas (*fingerprinting*) se han convertido en una valiosa herramienta como complemento de los métodos morfométricos para establecer criterios de distinguibilidad, uniformidad y estabilidad de las nuevas variedades, para detectar infracciones a la ley de derecho del obtentor y para el control de las colecciones de referencia (De Riek *et al.*, 2001).

### 1.1.3. PERSPECTIVAS FUTURAS

Sin dudas la floricultura nacional afronta un escenario de competitividad dado por el nuevo contexto mundial que caracteriza a esta actividad, como la integración regional y globalización de los mercados, la competencia de la flor importada, el surgimiento de nuevos mercados, la aparición de nuevas zonas de producción, la mayor diversificación de productos, la creciente demanda de servicios unidos al producto y el mayor desarrollo tecnológico preservando el medio ambiente (Parodi, 2009; Galantini, 2008; Klasman, 2007; Boschi y Molinari, 1996). En este marco se impone un aspecto esencial como es la mejora cualitativa de la producción, de manera de nivelarla con los países de avanzada en la materia. La incorporación de tecnología representa en una instancia superadora que debe acompañar a un proceso integral de cambio (Tanaka *et al.*, 2005). Tanto la biodiversidad como su conservación son de gran importancia para el desarrollo de un país, en este sentido su uso sustentable ofrece objetivas posibilidades para el futuro. En lo que a recursos genéticos se refiere, el germoplasma ornamental puede convertirse en una fuente de divisas genuinas y de beneficio sustentable, para aquellos países que realicen un aprovechamiento racional de los mismos. El uso de la Biotecnología juega un papel muy importante como instrumento para la investigación en el estudio de la diversidad genética y en programas de mejoramiento (Escandón, 2004; Escandón *et al.*, 2010).

## 1.2. CALIBRACHOA CERV. (EX LA LLAVE & LEXARZA)

### 1.2.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES

El género *Calibrachoa*, de considerable importancia como cultivo ornamental, pertenece a la tribu *Nicotianeae*, subfamilia *Cestroideae*, familia *Solanaceae* (Hunziker, 2001); el mismo fue establecido en 1825 por La Llave y Lexarza, con *C. procumbens* como especie tipo (Nov. Veg. Descr. 2: 3. 1825).

Históricamente las especies de *Calibrachoa* estuvieron incluidas dentro del género *Petunia* Jussieu (*Solanaceae*) por sus similitudes morfológicas. Fries (1911), el último revisor del género *Petunia*, determinó que todas las especies eran idénticas en los caracteres genéricos a *P. parviflora*, y trató a *Calibrachoa* como sinónimo de *Petunia*, incluyendo a todas las especies dentro de este último género, definido por Jussieu en 1803.

En 1985 Wijsman y de Jong estudiaron la taxonomía de *Petunia*, reconociendo la existencia de dos grupos de especies genéticamente distintos, con número de cromosomas diferentes ( $2n=14$  y  $2n=18$ ), ausencia de homología cariotípica y diferencias isoenzimáticas. Tomando como base estas evidencias, se reconocieron dos géneros diferentes, *Petunia sensu stricto* (s.s.) con  $2n=14$  y *Calibrachoa* Cerv. (ex La Llave y Lexarza) con  $2n=18$  -análisis de contenido de ADN más recientes (Bennett, 2005), reafirman este dato-, siendo diferenciables, además, en varias características morfológicas como el cáliz (lobulado hasta la mitad de su longitud), la corola (infundibuliforme, zigomorfa y con una pequeña giba) y la prefloración (conduplicada), entre otras diferencias.

Wijsman, en 1990, retoma el género *Calibrachoa* transfiriendo 15 especies de *Petunia* que compartían características morfológicas similares a *P. parviflora* a *Calibrachoa*. Posteriormente, Stehmann y Semir (1997), transfirieron 9 especies más a *Calibrachoa*; estos mismos autores en el año 2005 describen 2 nuevas especies que incluyeron en este último género, y en 2007, Stehman y Bohs (en Zuloaga, *et al.*, 2007), transfieren 3 especies a *Calibrachoa* que aún formaban parte de *Petunia*.

Una revisión del género *Calibrachoa* realizada por Stehmann (1999) aclara ciertas dudas taxonómicas, tomando como sinónimos ciertas especies clasificadas anteriormente. Finalmente el género cuenta con 28 especies (The Plant List, 2010), además se incluyen 2 nuevas especies que están en proceso de descripción (*C. irgangii* Stehmann, inéd y *C. longistyla* Stehmann y Greppi, en prensa).



En la Argentina existen 13 especies nativas de este género (Tabla 1) (Greppi y Stehmann, inéd), su centro de distribución es principalmente la región mesopotámica, excepto *C. parviflora* que se encuentra distribuida en gran parte del país (Tsukamoto et al, 2002; Ando et al, 2005).

### 1.2.2. CALIBRACHOA COMO GÉNERO ORNAMENTAL

Con respecto al uso ornamental, *Calibrachoa* es uno de los géneros más novedosos en el mercado. En el año 1992 la empresa japonesa Suntory Ltd. colocó en el mercado el primer cultivar de su serie llamada "Millon Bells". Actualmente se encuentran en el mercado mundial gran cantidad de cultivares, entre ellos "Millon Bells", "MiniFamous", "Callie", "Superbells" y "Sunbells" (Suntory Ltd., Nils Klemm). El género es conocido generalmente como "petunia salvaje", "seaside petunia" o "Million Bells"; y compite junto a *Impatiens* y *Petunia* como planta en maceta. Habitualmente se las utiliza en arreglos florales colgantes o en canteros. Es un género de propagación vegetativa, perenne y de durabilidad en los jardines; necesitan de suelos ácidos, fertilizados y bien drenados y exposición solar (Hagiwara, 2010). Son aptas para climas cálidos, aunque pueden adaptarse a climas fríos (Proven Winners, 2010) requieren mínimo mantenimiento y bajos costos, ambos aspectos muy importantes en la producción ornamental.

Dentro de las características ornamentales de las especies nativas del género, podemos mencionar la gran variabilidad en el tamaño y color de las flores, que van desde el blanco y amarillo hasta el fucsia y violeta (Tabla 1), como así también la diversidad en la forma y tamaño de las hojas. Los diferentes hábitos (erecto, decumbente y rastrero) le dan la plasticidad necesaria para adaptarse tanto a macetas, macetas colgantes, como a borduras y canteros. La mayoría de las especies son muy floribundas, floreciendo a lo largo de toda la primavera y el verano, fructificando en verano y otoño (Greppi, com. per.). Tienen la ventaja de ser autolimpiantes, es decir, que dejan caer las flores secas, sustituyéndolas por flores nuevas.

La mayoría de las especies permanecen con las corolas abiertas durante las horas de luz, produciéndose movimientos de la misma durante el día, cerrándose al anochecer, o días nublados, con excepción de *C. pygmaea* que permanece con la corola cerrada durante el día y se abre hacia el anochecer (Kanaya, et al., 2010). La mayoría de las variedades comerciales que existen desde principios de la década de los '90, de propagación agámica, no poseen movimientos diurnos de la corola (Kanaya, et al., 2010).

El programa de mejoramiento en el cual se haya enmarcado este trabajo, contempla, entre otros puntos, el aumentar la variabilidad de color de las corolas. En este sentido, el conocimiento de la



variabilidad existente en el género como en las poblaciones con la que se dispone, es de suma utilidad; como así también, contar con individuos que florezcan con fotoperíodos cortos (Moore, 1920), tanto para los ensayos de cruzamiento como para los análisis morfológicos. Las especies de *Calibrachoa* son consideradas de día largo (Berghauer, 2004), a excepción de *C. caesia* que es de día neutro (Facciuto *et al.*, 2006).







Se debe tener en cuenta que ante un proyecto de mejoramiento para la obtención de variedades, es importante conocer la variabilidad del germoplasma de partida, así como también contar con un método de identificación inequívoco de los individuos obtenidos para tal fin. Los métodos de caracterización tradicional están siendo complementados por los moleculares, permitiendo a los mejoradores tomar decisiones acorde a la selección del germoplasma a ser usado en los programas de cruzamientos (Jain *et al.*, 1999).






### 1.2.3. ZONA DE DISTRIBUCIÓN

*Calibrachoa* es un género mayoritariamente Sudamericano, que presenta distribución subtropical atlántica. Sólo *C. parviflora* posee un patrón de distribución distinto, con ocurrencia en América del Norte y en otros países, como especie invasora (Stehmann, 1999).

En Argentina, las especies del género, se encuentran distribuidas según la siguiente Tabla (Tabla 1), en la cual puede observarse también el nombre aceptado, la sinonimia, el hábito y la elevación (Greppi y Stehmann, inédito).

Especie	Sigla sp	Sinónimo	Hábito	Elevación (m.s.m.)	Distribución (Provincias)
<i>caesia</i> 	(Sendtn.) Wijsman	<i>Petunia caesia</i> Sendtn., <i>P. kleinii</i> L.B. Sm. & Downs, <i>Calibrachoa elegans</i> auct. non (Miers) Stehmann & Semir.	Subarbusto (perenne)	500-1500	MIS
<i>excellens</i> 	(R.E. Fr.) Wijsman	<i>Petunia hassleriana</i> R.E. Fr., <i>P. variabilis</i> R.E. Fr., <i>P. excellens</i> R.E. Fr., <i>P. intermedia</i> (Graham) G. Don, <i>P. linearis</i> (Hook.) Paxton <i>Calibrachoa hassleriana</i> (R.E. Fr.) Wijsman	Arbusto o subarbusto (perenne)	0-1300	COS, MIS

Especie	Sigla sp	Sinónimo	Hábito	Elevación (m.s.m.)	Distribución (Provincias)
<p><i>linearis</i></p> 	(Hook.) Wijsman	<i>Salpiglossis linearis</i> Hook., <i>Nierembergia intermedia</i> Graham	Subarbusto (perenne)	0-500	COS, ERI
<p><i>missionica</i></p> 	Stehmann & Semir		Arbusto (perenne)	0-500	COS, MIS
<p><i>ovalifolia</i></p> 	(Miers) Stehmann & Semir	<i>Petunia helianthemoides</i> Sendtn., <i>P. ovalifolia</i> Miers, <i>P. calycina</i> Sendtn., <i>Calibrachoa calycina</i> (Sendtn.) Wijsman	Hierba o subarbusto perenne	0-500	COS, MIS
<p><i>parviflora</i></p> 	(Juss.) D'Arcy	<i>Nierembergia viscidula</i> Kunth, <i>Salpiglossis prostrata</i> Hook. & Arn., <i>Nicotiana parviflora</i> (Juss.) Lehm., <i>Lindernia montevidensis</i> Spreng., <i>Petunia viscidula</i> (Kunth) Miers, <i>P. parviflora</i> Juss., <i>P. parviflora</i> Juss. var. <i>glabriuscula</i> , <i>P. parviflora</i> Juss. var. <i>villosa</i> , <i>Leptophragma montevidensis</i> (Spreng.) Dunal, L., <i>prostrata</i> (Hook. & Arn.) Benth., <i>Calibrachoa parviflora</i> (Juss.) Wijsman, comb. superfl.	Hierba anual	0-300	BAI, CAT, CHA, CHU, COR, COS, ERI, FOR, JUJ, LPA, MEN
<p><i>pubescens</i></p> 	(Spreng.) Stehmann	<i>Nierembergia pubescens</i> Spreng., <i>N. graveolens</i> Dunal, hom. illeg., <i>Petunia pubescens</i> (Spreng.) R.E. Fr.	Hierba perenne	0-200	COS
<p><i>pygmaea</i></p> 	(R.E. Fr.) Wijsman	<i>Petunia pygmaea</i> R.E. Fr.	Hierba anual	0-300	COS, ERI, MIS

Especie	Sigla sp	Sinónimo	Hábito	Elevación (m.s.m.)	Distribución (Provincias)
<i>thymifolia</i> 	(A. St.-Hil.) Stehmann & Semir	<i>Fabiana thymifolia</i> A. St.-Hil., <i>Petunia thymifolia</i> (A. St.-Hil.) Sendtn.	Subarbusto (perenne)	0-500	COS, ERI
<i>humilis</i> 	(R.E. Fr.) Stehmann & Semir	<i>Petunia humilis</i> R.E. Fr.	Subarbusto (perenne)	0-200	COS
<i>longistyla</i> 	Stehmann & Greppi (inéd)		Subarbusto (perenne)	0-100	COS
<i>irgangii</i> 	Stehmann (inéd)		Subarbusto (perenne)	0-200	MIS
<i>sp</i> 	Stehmann & Greppi (inéd)		Subarbusto (perenne)	0-500	MIS

Referencias:

Distribución (Provincias)					
BAI	Buenos Aires	CAT	Catamarca	CHA	Chaco
CHU	Chubut	COR	Córdoba	COS	Corrientes
ERI	Entre Ríos	FOR	Formosa	JUJ	Jujuy
LPA	La Pampa	MEN	Mendoza	MIS	Misiones

Tabla 1: Especies nativas del género *Calibrachoa*. Adaptado de Flora del Conosur (2010).

### 1.3. ANÁLISIS GENÉTICO DE LA POBLACIÓN

Los métodos de análisis genéticos de poblaciones se emplean para evaluar la variación genética observada en, por ejemplo, especies salvajes o en colecciones de individuos de un cultivo. Los análisis genéticos de la población son realizados preferentemente con grupo de datos codominantes, sin embargo en forma complementaria pueden hacerse estimaciones valiosas e informativas de la variación y relaciones con marcadores dominantes, dado el gran número de *loci* típicamente analizados; lo que proporciona buena cobertura del genoma y un gran número de datos (Weising *et al.*, 2005).

#### 1.3.1. DIVERSIDAD GENÉTICA

La diversidad genética constituye uno de los niveles biológicos en el que puede medirse o estimarse la biodiversidad. Esta escala involucra la variación de los genes dentro de cada especie, donde la diversidad genética representa la variación heredable dentro y entre poblaciones de organismos. Esta variación se manifiesta en las modificaciones ocurridas en la secuencia de nucleótidos del ADN, como consecuencia de la selección, mutación, migración, deriva génica y la combinación de estos eventos (Spooner *et al.*, 2005).

La detección y cuantificación de la variación genética ha progresado gradualmente desde las evaluaciones biométricas, los análisis fisiológicos, los estudios de polimorfismo cromosómico (variación en el número y morfología), los estudios bioquímicos isoenzimáticos, hasta el análisis a escala molecular que incluye el secuenciamiento del ADN, logrando detectar la variación a nivel nucleotídico (Nuez *et al.*, 2000).

Actualmente se dispone de varios tipos de marcadores de ADN con aplicaciones diversas tanto en poblaciones de especies nativas como en especies exóticas. Marcadores tales como los RFLPs, RAPDs, AFLPs, SSRs, ISSRs y SNPs, entre otros, que difieren entre sí respecto a su capacidad para detectar polimorfismo, modo de herencia (dominante/codominante), origen (genoma nuclear/orgánulos), costo de desarrollo, factibilidad de automatización, reproducibilidad de resultados y en cuya elección deben ser considerados, además, el objetivo del estudio y la escala de interés (individuo/población/región) (Edwards y McCouch, 2007).

##### 1.3.1.1. MÉTODOS PARA ESTIMAR LA DIVERSIDAD GENÉTICA

Uno de los posibles pasos a seguir luego de la caracterización de los recursos genéticos es la cuantificación de la diversidad genética en un grupo y/o el conocimiento de las relaciones genéticas

entre los individuos dentro del grupo. Esta cuantificación dá como resultado una visión general de la diversidad genética y ésta puede ser utilizada como criterio para comparar la eficiencia de los marcadores en los diferentes grupos en estudio (Laurentin, 2009).

#### 1.3.1.2. CUANTIFICACIÓN DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA

El estudio de la diversidad genética dentro y entre poblaciones es comúnmente abordado a través de dos aproximaciones, una de ellas se basa en la determinación de las frecuencias alélicas sobre un número de *loci* polimórficos y el empleo de parámetros basados en estas frecuencias para particionar la variación genética en los componentes de la variación dentro y entre unidades, mientras que la segunda alternativa emplea matrices de similitud/distancia construidos para todas las combinaciones posibles de pares de unidades, con la finalidad de caracterizar la población o conjunto de individuos, basados en la afinidad relativa de cada individuo respecto a todos y cada uno de los individuos analizados (Weising *et al.*, 2005)

Una medida simple de la cuantificación de la diversidad es el número de marcadores polimórficos, que a menudo se expresa como porcentaje (%P) de todos los marcadores anotados en un grupo de muestras. Un sistema es polimórfico cuando en el estado más común la frecuencia es menor de 0,95 (Ott, 1992). Para marcadores dominantes, en los cuales se asume que cada banda representa un *locus*, los estados se refieren a la presencia o ausencia de cada banda de cada uno de los individuos que componen el grupo en estudio. Por ejemplo, si una banda tiene una ocurrencia en el 94% de los individuos que componen el grupo, el estado más común será “presencia de la banda”, por lo tanto será considerada como polimórfica. Si la banda aparece sólo en el 6% de los individuos, el estado más común será “ausencia de la banda”, y esto ocurrirá en el 94% de los individuos, por lo que la banda será polimórfica. Por lo tanto, si la presencia de la banda (o la ausencia de la misma) ocurre al menos en el 95% de los individuos, la banda será considerada monomórfica (Laurentin, 2009).

Una de las medidas más frecuentemente usadas de variación genética es la **diversidad genética de Nei** (1973) o **heterocigosidad** ( $h$ ), la cual tiene en cuenta las frecuencias alélicas. La diversidad genética  $h$  es la probabilidad de que 2 alelos elegidos al azar sean diferentes en la muestra. La misma se calcula por *locus* como:

$$h = 1 - \sum_{i=1}^k p_i^2$$

donde  $h$  es la heterocigosidad en un *locus* cuando se estudia una población de apareamiento al azar, o la diversidad de un gen en un *locus* cuando los apareamientos no son azarosos en el grupo de estudio;  $h$  es la sumatoria de  $i=1$  a  $k$ ,  $p_i$  es la frecuencia del alelo  $i^{\text{th}}$  y  $k$  es el número de alelos. La diversidad genética  $h$  es luego promediada sobre el total de *loci* y a menudo se denota como  $H$  (ver más adelante).

La **diversidad genética de Nei** o también llamada contenido de información polimórfica (**PIC**) puede calcularse para datos dominantes bialélicos como:

$$h = 1 - p_i^2 - q_i^2$$

Aquí  $p$  es la frecuencia de los alelos visibles y  $q$  es la frecuencia de los alelos nulos para el marcador  $i$ .

En este caso, para los datos binarios diploides se asume el equilibrio de Hardy-Weinberg:

$$q = (1 - \text{frecuencia de la banda})^{1/2} \text{ y } p = 1 - q$$

El contenido de información polimórfica provee una estimación del poder discriminatorio de un *locus* teniendo en cuenta, no sólo el número de alelos que son expresados, sino también las frecuencias relativas de los mismos (Smith *et al.*, 1997); para datos dominantes tiene un máximo de 0,5 cuando la frecuencia toma el valor  $p=0,5$  (De Riek *et al.*, 2001).

Para obtener una visión más general de la diversidad en un grupo, la heterocigosidad o diversidad genética se calcula para cada *locus*. La estimación normalizada de esta medida es la Heterocigosidad esperada imparcial o normalizada (**UHe**) (Nei, 1978):

$$UHe = 2n(1 - \sum x_i^2)/(2n - 1)$$

donde UHe es la heterocigosidad o diversidad genética para un solo *locus*,  $x_i$  es la frecuencia del alelo  $i^{\text{th}}$  (o marcador) y  $n$  es el número de individuos.

El promedio de todos los *loci* (o marcadores) representará el promedio de la heterocigosidad (**H**) o el promedio de la diversidad genética en el grupo, calculada como:

$$H = \sum_{k=1}^r h_k / r$$

donde  $r$  es el número total de *loci*.

En una población ideal y apareada aleatoriamente,  $H$  es idéntica a la heterocigosidad esperada  $H_e$ .

Otra medida de diversidad, la cual se utiliza a menudo para datos dominantes, es el Índice de Shannon ( $H'$ ). Éste generalmente se calcula como:

$$H' = -\sum p_i \log_2 p_i$$

donde  $p_i$  es la frecuencia del alelo  $i^{\text{th}}$  en la población, grupo de individuos o especies, y ambos alelos (presencia y ausencia) de cada *locus* debe ser tomado en cuenta.

Alternativamente, el logaritmo natural es usado en lugar del  $\log_2$ . La fórmula quedaría de la siguiente manera:

$$H' = -\sum p_i \ln p_i$$

Se han propuesto algunas funciones para evaluar la eficiencia en la identificación de algún iniciador específico (o combinación de iniciadores). Estas funciones se basan tanto en los cálculos de frecuencias alélicas (o bandas), i.e. diversidad genética de Nei o contenido de información polimórfica, *marker index* (MI), propuesto por Powell *et al.* (1996) y el *Resolving power* (Rp), propuesto por Prevost y Wilkinson (1999), como en funciones probabilísticas. La heterocigosidad esperada es considerada una estimación del poder discriminatorio porque tiene en cuenta tanto el número de alelos como sus frecuencias relativas (Smith *et al.*, 1997). **MI** es una “heterocigosidad esperada ponderada” y se calcula como:

$$MI = N \times \left( 1 - \sum_{i=1}^k p_i^2 \right)$$

Donde  $N$  es el número de bandas polimórficas para el iniciador y  $p_i$  es la frecuencia del alelo  $i^{\text{th}}$  (el segundo término es el índice de diversidad genética definido por Nei).

El **Rp** (de las siglas en inglés de Resolving power -poder de resolución-) es definido por iniciador como:

$$Rp = \sum lb$$



donde  $I_b$  es la información de cada banda, la cual toma los valores de:  $1-(2x[0,5-p])$ , siendo  $p$  la proporción de cada individuo que contiene la banda.

#### 1.3.1.3. ANÁLISIS DE AGRUPAMIENTO

Esta metodología refiere a un grupo de técnicas cuyo principal objetivo es el de cuantificar la afinidad entre individuos o Unidades Operativas Taxonómicas (OTUs: *Operational Taxonomic Units*) basándose en el estado de los caracteres elegidos y agrupar las OTUs que presenten propiedades similares. De este modo las OTUs con mayor similitud son matemáticamente reunidas en un mismo grupo o *cluster*. Los grupos formados evidencian alta homogeneidad interna (dentro del *cluster*) y alta diferenciación externa (entre *clusters*).

Las principales características de estas técnicas se basan en la Teoría Fenética, la cual argumenta que una clasificación es tanto más informativa cuanto mejor refleja la similitud global de un grupo de OTUs, teniendo en cuenta, según Crisci y López Armengol (1983) los siguientes ítems:

1. La clasificación se realiza con un gran número de caracteres, tomados de todos los órganos/tejidos de un organismo y en cualquier momento de su ciclo vital
2. Todos los caracteres tienen el mismo peso clasificatorio
3. La clasificación no tiene en cuenta relaciones genealógicas o filogenéticas. Por lo tanto no puede inferirse que los grupos resultantes sean naturales (descendencia de un ancestro común)
4. Las clasificaciones se basan en las similitudes fenéticas. Se entiende por "fenético" cualquier tipo de carácter (morfológico, fisiológico, anatómico, citológico, molecular)
5. Puede utilizarse sin conocer la historia evolutiva del grupo de organismos en estudio

#### 1.3.1.4. COEFICIENTES DE ASOCIACIÓN Y DISTANCIA

La elección del coeficiente que permitirá medir el grado de semejanza entre dos OTUs está limitada a la escala de medida del estado de los caracteres.

Los **coeficientes de similitud** ( $S_{ij}$ ), dan una medida del grado de semejanza o similitud entre dos objetos  $i$  y  $j$ , en relación a los  $n$  caracteres bajo estudio. Estas medidas de similitud presentan un valor máximo para dos objetos idénticos y mínimo para dos objetos totalmente diferentes. La mayoría de estos coeficientes varían en un rango de 0 a 1.

Los marcadores moleculares se ajustan a este tipo de variables. Los coeficientes de similitud miden las coincidencias y diferencias en los estados de caracteres entre dos OTUs. Por lo tanto para caracterizar a dos OTUs se generan 4 diferentes posibilidades:

		OTU <i>j</i>		
		1	0	
OTU <i>i</i>	1	(1,1) <i>a</i>	(1,0) <i>b</i>	<i>a+b</i>
	0	(0,1) <i>c</i>	(0,0) <i>d</i>	<i>c+d</i>
		<i>a+c</i>	<i>b+d</i>	<i>n</i>

Donde: *i* y *j* son los pares de individuos comparados, 1 y 0 indica la presencia o ausencia de la banda, *a* es el número de bandas presentes en las 2 OTUs, *b* es el número de bandas presentes en la OTU *i* pero ausentes en la OTU *j*, *c* es el número de bandas presentes en la OTU *j* pero ausentes en la OTU *i*, *d* es el número de bandas ausentes en ambas OTUs y *n* es el número total de caracteres ( $a+b+c+d$ ).

En el caso de marcadores moleculares dominantes como ISSRs, RAPDs y AFLPs, se asume que cada banda amplificada corresponde a un alelo dominante, para un *locus* determinado, y por lo tanto sólo pueden ser detectadas dos condiciones: la presencia de banda (que representa la presencia del *locus* en estado de heterocigosis u homocigosis, sin poder discriminar entre ellos), codificando este estado con el valor "1" y la ausencia de banda (que representa la ausencia del *locus* o la presencia de alelos nulos), codificado con el valor "0".

#### 1.3.1.5. COEFICIENTES DE SIMILITUD PARA VARIABLES CUALITATIVAS DE TIPO DOBLE ESTADO

Existe una amplia gama de coeficientes de similitud, los cuales difieren en su enfoque para estimar el número de coincidencias y diferencias. Entre los más comúnmente utilizados para datos dominantes se encuentra:

➤ **Coficiente de Concordancia Simple o Simple Matching** (Sneath and Sokal, 1973)

$$SM = (a + d) / (a + b + c + d)$$

El mismo toma en consideración tanto las presencias compartidas (1,1) como las ausencias compartidas (0,0) como factores que contribuyen a la similitud entre dos individuos, maximizando la información de los perfiles de amplificación dado que considera todos los *loci* anotados. La doble ausencia de banda (considerada como *loci* homocigotos recesivos), como la doble presencia (considerada como homocigotos dominantes o heterocigotos), tienen la misma importancia biológica (Bonin *et al.*, 2007; de Vicente *et al.*, 2004).

Este coeficiente puede variar entre un valor mínimo de 0 (cuando el par de individuos no tienen bandas en común) y un valor máximo de 1 (cuando todas las bandas presentes en un individuo están presentes en el otro), además de presentar propiedades métricas Euclidianas que permiten su uso en un análisis molecular de la varianza (AMOVA) (Bonin *et al.*, 2007; Franco *et al.*, 2001).

A pesar de las diferencias en la similitud de cada par comparado resultante de usar diferentes coeficientes, la mayoría de los estudios publicados no explican la elección del mismo, en relación al tipo de marcador o el nivel de ploidía de los organismos bajo estudio, con lo cual, no existe un criterio universal que permita elegir el coeficiente de similitud más adecuado cuando se analizan marcadores moleculares (Kosman y Leonard, 2005).

### 1.3.2. MÉTODOS PARA EL ANÁLISIS DE AGRUPAMIENTO

El propósito de producir un dendrograma es visualizar la mejor representación de las relaciones fenéticas (similitud global) o filogenéticas (historia evolutiva) entre un grupo de OTUs. Los métodos para el análisis de agrupamiento comprenden las técnicas empleadas para la formación de grupos de OTUs que se asocian sobre la base del grado de similitud (Crisci y López Armengol, 1983). Se pueden distinguir 3 estrategias principales: los métodos de distancia, los métodos de parsimonia y los métodos de máxima probabilidad. En este trabajo se utilizó únicamente el método de distancia.

Los *métodos de distancia*, también son llamados como análisis de grupo o métodos fenéticos. El punto de partida son los datos de la matriz binaria de distancia, la cual se calcula de los datos primarios obtenidos de los algoritmos de Dice, Jaccard o Simple Matching, entre otros. Establecido este coeficiente, se debe definir el algoritmo de clasificación para determinar la estructura de agrupación de las OTUs. En términos generales, el primer paso de la construcción de un árbol consiste en que las 2 OTUs con menor distancia son agrupadas juntas, y la matriz de distancia se reduce en una fila y una columna. Luego, un segundo análisis de agrupamiento se lleva a cabo, agrupando las 2 OTUs más cercanas juntas. Este proceso se reitera hasta que queda sólo una OTU. El

resultado del dendrograma expresa las similitudes fenéticas entre las OTUs, por lo que se lo llama **fenograma**. Éste, no necesariamente refleja relaciones filogenéticas.

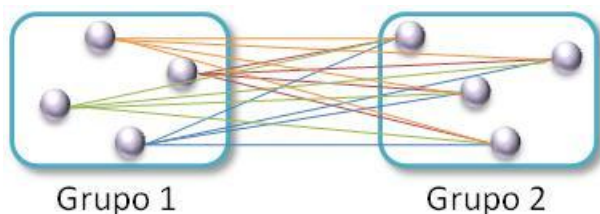
### 1.3.2.1. ALGORITMOS DE CLASIFICACIÓN

Dentro de las técnicas de clasificación, se desarrollarán las propuestas por Rohlf en el programa NTSYS-pc (Rohlf, 1998). Las mismas refieren a las técnicas del tipo *pair group* o grupo par, en las cuales puede admitirse una OTU o un conjunto de OTUs por nivel, lo que implica que los grupos formados en cualquier etapa de los progresivos agrupamientos contienen sólo dos miembros (Crisci y López Armengol, 1983)

#### LIGAMIENTO PROMEDIO

o Metodo de agrupamiento de pares no ponderados empleando la media aritmética (UPGMA)

Es el método más frecuentemente usado, donde se considera que el valor de similitud entre la OTU candidata a incorporarse y el grupo o núcleo es igual a una similitud promedio, resultante de los valores de similitud entre el candidato y cada uno de los integrantes del grupo o núcleo. El ligamiento promedio tiende a juntar grupos con poca varianza y a producir grupos de varianza semejante.



$d(1i, 2j)$  = distancia promedio entre la OTU $i$  y la OTU $j$  de los Grupos 1 y 2

El UPGMA asume un reloj biológico rígido, lo que significa que los índices evolutivos a lo largo de todas las ramas del árbol necesitan ser idénticos (Weising *et al.*, 2005).

Todos los métodos de agrupamiento se basan en la similitud global entre los pares de OTUs, y por lo tanto la información acerca de marcadores (caracteres) particulares se pierde. No hay fragmentos que se consideren más informativos que otros. Solo un fenograma óptimo se produce de un grupo de datos, y no hay manera de comparar o ranquear fenogramas subóptimos. Los métodos de agrupamiento computacionales son simples y pueden manejar un gran número de datos, dentro de los cuales encontramos al programa NTSyS (Weising *et al.*, 2005).

## DEFINICIONES

*Núcleo*: es todo conjunto formado por dos OTUs

*Grupo o Cluster*: es todo conjunto formado por más de dos OTUs

*Dendrograma*: es una representación geométrica de una clasificación jerárquica. Se utiliza para representar las relaciones ente organismos. Dependiendo de sus características y usos recibe distintos nombres. Dendrograma, por lo tanto, es un nombre genérico que se aplica indistintamente a cualquier tipo de árbol.

*Fenograma*: es un dendrograma que muestra la relación en grado de similitud fenética entre dos OTUs o grupos de OTUs. La longitud de sus ramas es proporcional al grado de semejanza fenotípica entre los organismos. No da ninguna información sobre la evolución de los organismos porporcionando únicamente un diagrama de relación fenotípica.

### 1.3.2.2. MEDIDA DE LA DISTORSIÓN DEL FENOGRAMA

El método de ligamiento que se emplea para agrupar los individuos puede generar distorsiones en el fenograma respecto de los datos de similitud originales. La cuantificación de dicha distorsión se realiza mediante el cálculo de un coeficiente de correlación denominado “cofenético”, que consiste en correlacionar la Matriz de similitud original con una Matriz cofenética, que surge de las similitudes observadas entre los pares de individuos comparados, en este caso, a partir de los datos del fenograma. Al finalizar el ejercicio de agrupación, se evalúa si se mantienen o no las distancias originales (Sokal y Rohlf, 1994 en de Vicente *et al.*, 2004)

## 1.4. MARCADORES GENÉTICOS

“Un marcador genético es cualquier diferencia fenotípica controlada genéticamente y utilizada en el análisis genético” (Nuez *et al.*, 2000). Por lo tanto, se aplica el nombre marcador a todo *locus*, sea del tipo que sea (secuencia de ADN con o sin función específica), que se utiliza para indicar la presencia cercana de un gen de interés, que tiene que ser polimórfico, un carácter cuantificable que puede detectar variación ya sea en una proteína o en una secuencia de ADN (Cubero, 2003; Nuez *et al.*, 2000). Una diferencia, ya sea fenotípica o genotípica, puede actuar como marcador genético si identifica en un individuo características del genotipo, del fenotipo, o de ambos y si, además, puede hacerse seguimiento a su herencia a través de varias generaciones. Es posible que un carácter genético no tenga efectos observables en el comportamiento de un individuo. A veces, sin embargo, este carácter puede estar ligado a otros caracteres (o correlacionado con ellos) que son más difíciles de medir y afectan el comportamiento del individuo. En tales casos, estos caracteres genéticos no

observables pueden usarse como marcadores genéticos de caracteres que están ligados a ellos, porque indican indirectamente la presencia de una característica de interés (o en estudio). Puede haber una correlación entre los dos tipos de caracteres, y ésta se conoce mediante un análisis de herencia, es decir el estudio de la distribución de la característica tanto en los progenitores como en su descendencia (Cubero, 2003; Nuez *et al.*, 2000; Capel *et al.*, 2000). Un ejemplo de esto es el mapeo genético, basado en la segregación de un carácter, evaluado en una población de mapeo.

#### 1.4.1. PROPIEDADES DE LOS MARCADORES MOLECULARES

El análisis de la diversidad genética y de las relaciones entre e intra poblaciones, especies e individuos es la tarea central para muchas disciplinas de las ciencias biológicas. Durante las últimas 3 décadas, las estrategias clásicas para la evaluación de la variabilidad genética, tales como la anatomía comparativa, morfología, embriología y fisiología, progresivamente han sido complementadas por las técnicas moleculares. Estas incluyen, por ejemplo, el análisis de los constituyentes químicos (también llamado metabolómica y proteómica), pero principalmente, el mayor aporte deriva del desarrollo de los marcadores moleculares. La tecnología de los marcadores moleculares se basa en que los polimorfismos son detectados a nivel de secuencia del ADN, ya sea nuclear, o del ADN de mitocondrias o cloroplastos, por lo que su número sería potencialmente ilimitado (Agarwal *et al.*, 2008; Mohammadi y Prasanna, 2003).

Una de las principales características que debe tener una técnica para generar marcadores moleculares es sensibilidad, entendiéndose como tal a la capacidad de para generar el mayor número de bandas posibles por variable de ensayo (i.e. por iniciador). Fundamentalmente, la utilidad de un marcador depende del contenido de información y del número de marcadores generados por éste (Thimmappaiah *et al.*, 2009).

#### 1.4.2. APLICACIONES DE LOS MARCADORES MOLECULARES

Los polimorfismos de ADN son ampliamente utilizados en todos los aspectos de la genética moderna debido a que proporcionan un gran número de marcadores genéticos de fácil acceso para el mapeo genético y otros fines. Entre sus usos, podemos mencionar los siguientes (Nuez *et al.*, 2000, Borém y Teixeira Caixeta, 2006):

- **Identificación de individuos:** Los polimorfismos de ADN tienen una aplicación como una forma de tipificación de ADN (*DNA fingerprinting*) para identificar los diferentes individuos

en una población. Análisis de ADN se utilizan para determinar el grado de relación genética entre los organismos individuales de una población.

- **Mejora de plantas domesticadas.** Mejoradores de plantas utilizan a los polimorfismos del ADN como marcadores genéticos en estudios de pedigrí para identificar, mediante el mapeo genético, los genes que se asocian con rasgos favorables a fin de incorporar estos genes en variedades mejoradas.
- **Historia de la domesticación.** Los mejoradores de plantas también estudian los polimorfismos genéticos para identificar a los antepasados silvestres de plantas cultivadas, así como para inferir las prácticas de selección artificial que dieron lugar a cambios genéticos en estas especies durante la domesticación.
- **Estudios poblacionales.** Los polimorfismos de ADN se utilizan para evaluar el nivel de variación genética en diversas poblaciones de organismos que difieren en la organización genética (procariotas, eucariotas, orgánulos), tamaño de la población, estructura mejorada, o la historia de los caracteres, los mismos son usados dentro de las subpoblaciones de una especie como indicadores de la historia de la población, los patrones de migración, y así sucesivamente.
- **Relaciones evolutivas entre especies.** Las diferencias en secuencias de ADN homólogas entre las especies es la base de la sistemática molecular, en la que las secuencias son analizadas para determinar la historia ancestral (filogenia) de las especies y para determinar el origen de los tipos morfológicos, de comportamiento, y otras de las adaptaciones que han surgido en el curso de la evolución.
- **Identificación de patógenos.** Los estudios en el área molecular, han permitido que los procedimientos para la detección e identificación de fitopatógenos sean más rápidos, específicos y confiables, teniendo un fuerte impacto en programas de protección y certificación de plantas, en cuanto al mejor entendimiento de la ecología y la epidemiología de los fitopatógenos.

### 1.4.3. PROPIEDADES MÁS DESEABLES PARA UN MARCADOR MOLECULAR

1. Sensibilidad (alto número de fragmentos amplificados por iniciador)
2. Moderado a alto polimorfismo (multialélico)
3. Herencia codominante (lo que permitiría la discriminación de los estados homo y heterocigotos en organismos diploides)

4. Asignación inequívoca de los alelos
5. Distribución frecuente y uniforme en todo el genoma
6. Discriminante (i.e. que detecte diferencias entre individuos estrechamente relacionados)
7. No epistático (i.e. se puede leer el genotipo a partir del fenotipo, independientemente del genotipo de otros *loci*)
8. Comportamiento selectivamente neutro (i.e. sin efectos pleiotrópicos, las sustituciones alélicas no tienen efectos fenotípicos)
9. No sujeto a influencias ambientales (i.e. ser independiente del ambiente en que vive el individuo o de su etapa de desarrollo)
10. Detectables en cualquier etapa del desarrollo
11. Ensayos fáciles y rápidos (por ejemplo por procedimientos automatizados)
12. Alta reproducibilidad
13. Intercambio sencillo de datos entre laboratorios
14. Bajo costo tanto para el desarrollo de los marcadores como de los ensayos

Estas ventajas no implican que la información tradicional utilizada para caracterizar la biodiversidad no sea valiosa; por el contrario, los datos morfológicos y fisiológicos continuarán proporcionando información práctica y a menudo crítica requerida para caracterizar recursos genéticos. Los métodos moleculares han tendido a complementar los análisis tradicionales, haciendo que el número de caracteres a analizar sea virtualmente ilimitado, y de una resolución tal, como para detectar cambios en un único nucleótido (Debener, 2002)

Los marcadores moleculares difieren en muchos aspectos y por consiguiente deben ser elegidos y analizados diferencialmente de acuerdo al material y objetivo de estudio. Hasta el momento, no hay un marcador que cumpla con todos los requisitos. Sin embargo, se puede elegir entre una gran variedad de marcadores, que pueden utilizarse tanto solos como combinados a fin de obtener las características mencionadas anteriormente. De todos modos, el tipo de marcador a utilizar dependerá de las necesidades de cada investigación (Arif *et al.*, 2010). La Tabla 2 resume las principales propiedades de los marcadores morfológicos y de los moleculares.



Marcadores Morfológicos	Marcadores Moleculares
Influencia del ambiente	Sin influencia ambiental y neutros
Número de marcadores limitado	Número de marcadores ilimitado
Baja cobertura del genoma	Amplia cobertura del genoma
Bajo nivel de polimorfismo	Alto nivel de polimorfismo
Caracteres de madurez	Análisis en fases tempranas
Menos informativos (dominantes o recesivos)	Más informativos (en gral. codominantes)
Entrenamiento y subjetividad	Sencillos, rápidos y objetivos

**Tabla 2: Comparación de las propiedades de los marcadores morfológicos vs los marcadores moleculares.**

#### 1.4.4. INTERPRETACIÓN GENÉTICA

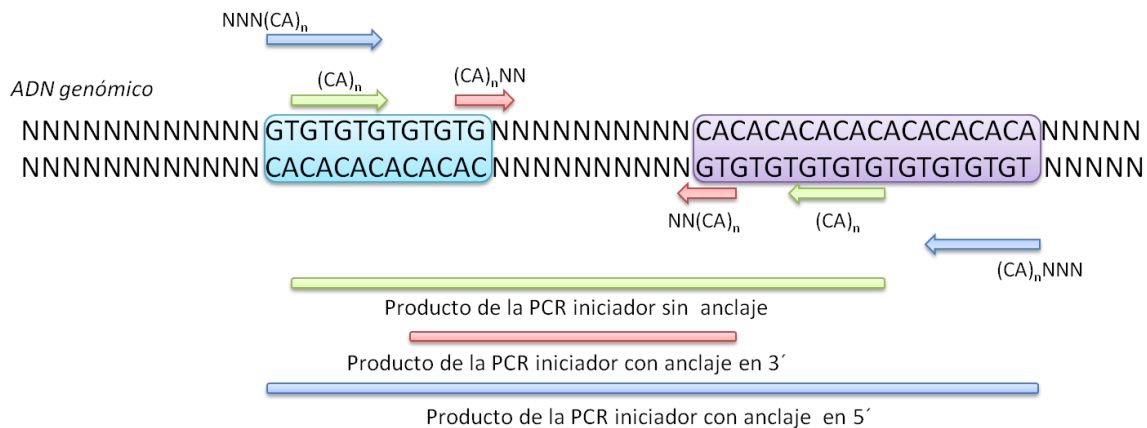
El resultado observable del desarrollo de cualquier tipo de marcador es un patrón de bandas (o de picos cuando se obtiene un patrón con secuenciadores automáticos). Cada banda corresponde a la posición de un fragmento de ADN separado previamente en función de su tamaño por medio de electroforesis en una matriz porosa, habitualmente un gel de agarosa o acrilamida. La hipótesis de partida es que cada banda corresponde a un alelo de un *locus* determinado. Si el marcador analizado es codominante, cada individuo heterocigoto tiene otro alelo situado en otra posición del gel, es decir, correspondiente generalmente a un fragmento de ADN con un número de bases distinto. Si el marcador es dominante, no es posible reconocer al individuo heterocigoto frente al homocigoto, y solamente existen dos fenotipos: el que presenta la banda y el que no la tiene. La presencia de banda es dominante sobre su ausencia (García-Mas *et al.*,2000).

#### 1.4.5. MARCADORES MOLECULARES BASADOS EN LA AMPLIFICACIÓN SEMIARBITRARIA DEL ADN – ISSR (INTER SIMPLE SEQUENCE REPEATS, MICROSATÉLITES ANCLADOS)

Acrónimos: SPAR: single iniciador amplification reactions; MP-PCR: Microsatellite-primed PCR; AMP-PCR: anchored microsatellite-primed PCR

Los microsatélites son regiones genómicas hipervariables constituidas por repeticiones en tándem de unos pocos pares de bases (1 a 6). Son abundantes, altamente variables y se encuentran distribuidos proporcionalmente a lo largo de todo el genoma. Este tipo de ADN repetitivo es común en organismos eucariotas, aunque también se lo ha encontrado en organismos procariotas y el número de unidades repetidas varía ampliamente entre los mismos, hallándose en algunos hasta 50 copias de la unidad repetida (Rakoczy-Trojanowska y Bolibok, 2004). Sin embargo, las regiones con una mayor abundancia de estas secuencias han sido encontradas y son llamadas “SSR hot spots” (Zietkiewicz *et al.*, 1994). Tales regiones pueden servir como fuente para marcadores ISSR.

La técnica de los ISSR se basa en la amplificación de segmentos de ADN cuya longitud puede variar entre 100 pb y 3000 pb, entre dos regiones idénticas de microsatélites orientadas en sentido opuesto. (Spooner *et al.*, 2005; Rakoczy-Trojanowska y Bolibok, 2004; Pradeep Reddy *et al.*; 2002, Zietkiewicz *et al.*, 1994) (Figura 1). Los iniciadores ISSR (16-25 pb) son diseñados a partir de las secuencias microsatélites a las que se les incorpora un número variable de nucleótidos arbitrarios (usualmente 1-4), sólo en uno de los extremos 5' ó 3' (de Vicente *et al.*, 2004; Rakoczy-Trojanowska y Bolibok, 2004; Zietkiewicz *et al.*, 1994). Las repeticiones microsatélite utilizadas como iniciadores pueden ser di-tri-tetra o penta-nucleótido (Pradeep Reddy *et al.*, 2002). Se pueden utilizar tanto iniciadores no anclados, como anclados. Sin embargo, los no anclados requieren de una optimización mucho más cuidadosa de las variables de la PCR para lograr condiciones exigentes de reacción, que permitan generar patrones reproducibles (Bornet y Branchard, 2001). Mientras que la mayoría de los iniciadores con repeticiones de tri y tetranucleótidos podrían trabajar bien sin anclaje, los iniciadores con repeticiones de dinucleótidos necesitan de un anclaje en 3' ó 5' degenerado o no degenerado para obtener patrones más definidos (Weising *et al.*, 2005).



**Figura 1:** El diagrama presenta tres puntos diferentes: **(1)** La secuencia del ADN original, en la cual se identifican dos secuencias repetidas diferentes (GT), orientadas en sentido inverso. Entre las dos secciones repetidas hay, además, un espacio bastante corto. **(2)** Si los iniciadores se diseñaran solamente del interior de la región repetida, se amplificaría la sección entre las repeticiones pero podría no estar garantizada la especificidad del locus. En la segunda hilera (ver diagrama), aparece un producto de la PCR como resultado de la amplificación de un iniciador anclado en 3' (CA)<sub>n</sub>NN en cada extremo de la región entre las repeticiones. CA es la secuencia que se alargó en NN, dos nucleótidos que entran dentro de la región situada entre las repeticiones. **(3)** Alternativamente, las anclas pueden elegirse de la región 5'. El producto de la PCR de la tercera hilera resulta de emplear iniciadores basados en la repetición CA pero prolongados en el extremo 5' por NNN. Modificado de Pradeep Reddy, 2002.

Los iniciadores anclados tienen varias ventajas sobre las variantes no ancladas, la primera de ellas comprende el diseño del iniciador, que asegura la hibridación del mismo sólo en los extremos del microsatélite (5' ó 3'), con lo cual se evita la hibridación inespecífica dentro del microsatélite -el anclaje asegura que cada amplificación es iniciada en la misma posición nucleotídica en cada ciclo de PCR- incrementando así, la reproducibilidad de la técnica y evitando el chorreado. Segundo, permite que sólo un subgrupo de las regiones entre repeticiones blanco sean amplificadas, con lo cual se reduce el alto número de productos de PCR esperado para regiones entre repeticiones dinucleotídicas, obteniendo de 10 a 50 bandas fácilmente resolubles. Tercero, los iniciadores anclados en 5' aseguran que el microsatélite blanco (y potencialmente hipervariable) es parte del producto amplificado (*loci* SSR anónimo) (Zietkiewicz *et al.*, 1994; Weising *et al.*, 2005; Rakoczy-Trojanowska y Bolibok, 2004). Por último, anclajes comparativamente largos, sumado a la longitud de los iniciadores (16-25 pb), pueden prevenir el deslizamiento del iniciador, debido a que se permiten condiciones de hibridación más exigentes (temperaturas de hibridación de 45-60°C, las mismas dependen del contenido de GC del iniciador) (Weising *et al.*, 2005; Pradeep Reddy *et al.*, 2002). Las secuencias de anclaje que a menudo se diseñan con posiciones de bases degeneradas (i.e. BDB(CA)<sub>8</sub>,

con B=C, G, o T, y D= A, G o T), frecuentemente incrementan el número total de fragmentos amplificados (Weising *et al.*, 2005).

Los fragmentos de múltiples *loci* generados simultáneamente, son separados por electroforesis, ya sea en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio o SYBR Green, o bien en geles de poliacrilamida teñidos con plata, incluso es posible la separación de los fragmentos mediante autoradiografía y por secuenciación automática de fragmentos con marcas fluorescentes (Weising *et al.*, 2005).

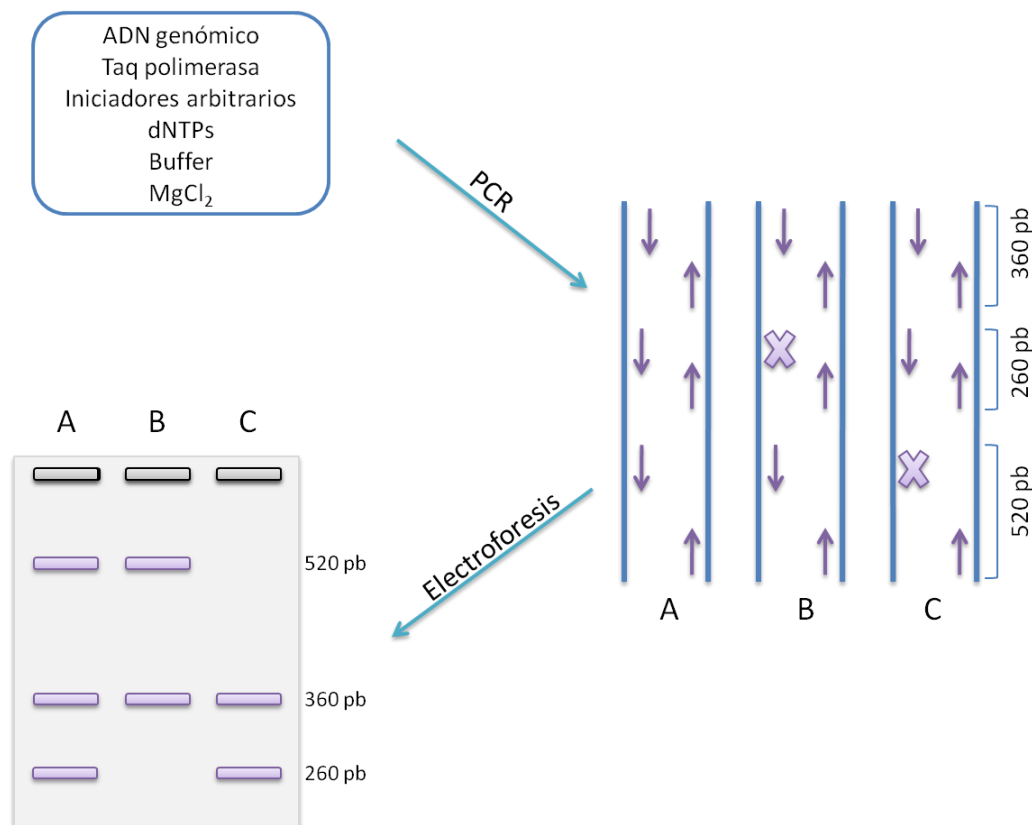
Una de las principales ventajas de este método respecto de la utilización de SSR, es el hecho de que no es necesario el conocimiento de la secuencia para el diseño de los iniciadores, con lo cual se evita la construcción de una librería genómica, tiempo y dinero (Rakoczy-Trojanowska y Bolibok, 2004), y al ser los ISSR iniciadores *multiloci* poseen la ventaja de revelar polimorfismo en muchos *locus* simultáneamente, así que una pequeña colección de iniciadores es suficiente para cubrir una fracción representativa del genoma (Gupta *et al.*, 1999).

Debido a que el procedimiento analítico incluye PCR, sólo bajas cantidades de ADN son necesarias (5-50 ng por reacción). Otro beneficio de los marcadores ISSR es la posibilidad de estudiar la abundancia de los SSR y su distribución en los genomas. Las bandas producidas por un iniciador ISSR con una dada repetición microsatélite, podría reflejar la frecuencia relativa de los motivos en un genoma de interés (Van der Nest, *et al.* 2000 en Rakoczy-Trojanowska y Bolibok, 2004).

Las fuentes de variabilidad en los ISSRs se pueden atribuir a alguna de las siguientes razones o combinaciones de éstas:

- ADN templado: Variabilidad en el número de nucleótidos dentro de una repetición microsatélite resultará en polimorfismos de longitud cuando se usan iniciadores anclados en 5'. Estos polimorfismos pueden resultar de varios tipos de eventos: (1) la inserción de una gran porción de ADN entre los sitios de unión puede exceder la capacidad de la PCR, resultando en la pérdida de fragmentos, (2) la inserción o delección de una pequeña pieza de ADN llevará a un cambio en el tamaño del fragmento amplificado, (3) la delección de uno o los 2 sitios de hibridación de los iniciadores resultará en la pérdida de un fragmento o en un incremento en el tamaño, (4) la sustitución de un nucleótido dentro de uno o ambos sitios blanco del iniciador puede afectar en el proceso de hibridación, el cual puede ocasionar la presencia versus la ausencia de polimorfismo o un cambio en el tamaño del fragmento (Figura 2).

- Naturaleza del iniciador: El grado de polimorfismo varía con la naturaleza (no anclado, anclado en 3' o anclado en 5') y la secuencia de repetición (motivo) del iniciador empleado.
- Método de detección: El nivel de polimorfismo detectado varía dependiendo del método de detección usado. Los geles de poliacrilamida, en combinación con marcación radiactiva o teñidos con nitrato de plata, o bien geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio o SYBR green. Se encuentra un notable aumento en el número de fragmentos amplificados cuando se utiliza poliacrilamida en comparación con agarosa (Moreno *et al.*, 1998, en Pradeep Reddy *et al.*, 2002).



**Figura 2:** Estrategia de PCR con iniciadores ISSR. ADN genómico, una ADN polimerasa termoestable, un iniciador de secuencia arbitraria, los cuatro deoxiribonucleótidos trifosfatos (dNTPs), el MgCl<sub>2</sub> y el buffer de reacción se combinan en un tubo de reacción y son sujetos a una PCR. Los iniciadores hibridan con las secuencias blanco homólogas del templado de ADN. Si 2 iniciadores (indicados en el gráfico como flechas, no dibujadas en escala) hibridan en direcciones opuestas y están a una distancia adecuada uno de otro, la secuencia de ADN entre los 2 iniciadores será amplificada. Los productos de PCR son separados mediante electroforesis en gel de agarosa y visualizados por teñido con bromuro de etidio. Varios mecanismos pueden resultar en la presencia vs. ausencia de polimorfismo (ver texto). Por ejemplo, la sustitución de una base dentro del sitio de unión del iniciador (indicado por X) puede interferir con la hibridación del iniciador, y por lo tanto impedir la amplificación de un respectivo fragmento. Modificado de Weising *et al.*, 2005.

La técnica de los ISSR combina la mayoría de los beneficios de los AFLP y los microsatélites (SSR), con la universalidad de los RAPD. La Tabla 3 resume las características principales de estos marcadores.

MARCADOR	ISSR	RAPD	SSR	AFLP
<b>CARACTERÍSTICA</b>				
Abundancia genómica	Alta	Alta	Alta	Alta
Nivel de polimorfismo	Medio / Alto	Medio	Alto	Medio
Específico de <i>locus</i>	No	No	Si	No
Codominancia	No / Si	No	Si	No / Si
Reproducibilidad	Media / Alta	Baja	Alta	Media / Alta
Laboriosidad	Baja	Baja	Baja / Media	Media
Demanda técnica	Baja / Media	Baja	Baja / Media	Medio
Costos operacionales	Bajos	Bajos	Bajos / Medios	Medios
Costo de desarrollo	Bajo	Bajo / Medio	Alto	Bajo
Cantidad de ADN requerido	Baja	Baja / Media	Baja	Baja
Facilidad de automatización	Si	Si	Si	Si

**Tabla 3: Comparación de las características principales de las técnicas moleculares para identificar diversidad genética. Los criterios empleados para asignar el nivel dentro de cada columna se basan en los resultados descritos en la literatura científica. Modificado de Spooner *et al.*, 2005 y Agarwal *et al.*, 2008.**

Como los ISSR son una técnica *multilocus*, dentro de las desventajas se incluye la posible no homología de fragmentos de igual tamaño. A pesar del hecho que los ISSR segregan mayormente como marcadores dominantes, siguiendo una herencia mendeliana simple (Gupta *et al.*, 1994; Ratnaparkhe *et al.*, 1998) y rara vez muestran segregación como marcadores codominantes (Sankar y Moore, 2001), al ser marcadores del tipo aleatorio, son útiles para muchos propósitos. Dentro de los muchos usos para los que pueden ser utilizados, podemos mencionar: estudios filogenéticos, evaluación de la diversidad genética, identificación varietal (Wolfe *et al.*, 1998, Zietkiewicz *et al.*, 1994), estudios taxonómicos de especies estrechamente relacionadas y monitoreo de la variación somaclonal (Leroy *et al.*, 2001). Por otro lado, marcadores ISSR ligados a rasgos agronómicos de importancia, han sido secuenciados y usados como un marcador STS en selección asistida por marcadores. A pesar que los microsatélites son mayoritariamente no funcionales y selectivamente

neutros, es sabido que un porcentaje de ellos está ligado a regiones codificantes, de manera que, los ISSRs pueden señalar regiones ricas en genes (Kojima *et al.*, 1998, en Pradeep Reddy *et al.*, 2002).

En resumen, podemos decir de la técnica de ISSR que: (1) se produce un patrón de bandas multilocus tipo *fingerprint*, (2) no es necesario el conocimiento previo de la secuencia genómica del ADN, y (3) los iniciadores pueden ser usados universalmente para la mayoría de pro y eucariotas. A pesar de que *a priori* no se conoce nada acerca de la identidad y del contexto de la secuencia de un producto particular de PCR, su presencia o ausencia en diferentes organismos, puede servir como caracter informativo.

#### 1.4.6. MARCADORES MOLECULARES EN FLORICULTURA

La aplicación de marcadores moleculares en floricultura ha permitido la caracterización de al menos 45 géneros de importancia ornamental. *Alstroemeria*, *Lilium*, *Gerbera*, *Petunia*, *Pelargonium*, *Chrysantemun* y *Rosa*, son algunos de los géneros estudiados (Escandón *et al.*, 2010).

##### 1.4.6.1. UTILIZACIÓN DE LOS MARCADORES EN LA MEJORA VEGETAL

Tanto el conocimiento de la diversidad genética de los materiales bajo estudio, así como de las relaciones genéticas entre individuos, son condiciones que permiten complementar las estrategias empleadas para que los programas de mejoramiento y conservación sean eficaces. Un programa de mejoramiento comienza a partir de una caracterización adecuada del germoplasma, tomando conocimiento de la base genética de la cual se dispone y de la variabilidad existente en la misma (Cubero, 2003).

Al realizar un programa de mejora genética, las posibilidades de éxito serán función tanto del material de partida como de la elección del método apropiado. Por lo tanto una eficaz prospección de la variación disponible y el conocimiento de los lugares en que podemos encontrarla, brinda información clave para los programas de mejora. Por ello, la formación, mantenimiento y estudio de colecciones es de la mayor importancia para las futuras obtenciones vegetales (Cubero, 2003).

El uso de marcadores moleculares para el análisis genético de diversidad y como una herramienta de selección es de alta prioridad en el desarrollo de nuevos cultivares ornamentales y en el aprovechamiento de la diversidad. La información de la variabilidad genética es importante para la selección de los clones parentales y en la predicción de la *performance* de los híbridos. La predicción de la heterosis antes de llevar a cabo los cruzamientos permitiría ahorrar un considerable número de cruzamientos con la consecuente reducción de tiempo y recursos (Edwards y Mogg, 2001).

Además de estimar la diversidad genética, estas herramientas pueden ser utilizadas en el mejoramiento genético de las plantas; cada vez más se está utilizando la manipulación asistida por marcadores moleculares, con vistas de obtener la mayor eficiencia en la transferencia de los factores genéticos. Los marcadores moleculares ligados a diferentes características de importancia económica se han desarrollado, permitiendo una selección indirecta de características deseables en procesos de generaciones segregantes, además del desarrollo de mapas genéticos y como *quantitative trait loci* (QTLs) (Meerow, 2005).

Además de su importancia en el mejoramiento, los marcadores también son importantes en estudios y análisis genéticos de plantas. En este contexto, los marcadores moleculares son herramientas útiles tanto para detectar variaciones en el genoma, aumentando el poder de análisis genético en las mismas, como para obtener una huella digital genética o *fingerprint* con aplicación en los derechos de propiedad intelectual (Borém y Teixeira Caixeta, 2006).

A continuación se enumeran algunas de las aplicaciones presentes de los marcadores genéticos en diversos aspectos de la mejora vegetal (Borém y Teixeira Caixeta, 2006):

1. Conservación y uso de los recursos genéticos
2. Conocimiento y uso del sistema reproductivo
3. Selección asistida por marcadores (MAS)
4. Desarrollo de plantas transgénicas
5. Identificación varietal
6. Utilización de marcadores en la agroindustria

#### 1.4.6.2. APLICACIÓN DE LOS MARCADORES MOLECULARES EN ESTUDIOS DE DIVERSIDAD GENÉTICA

Desde principios de siglo, la caracterización de los diferentes cultivos de interés ornamental se ha llevado a cabo con la ayuda de caracteres morfo-agronómicos y más recientemente con isoenzimas y proteínas de reserva. Las características morfológicas externas de las plantas fueron los primeros marcadores que se utilizaron y suelen ser habitualmente el primer paso de la identificación. Sin embargo, estos marcadores presentan los inconvenientes tales como: su reducido número, el estar frecuentemente influenciados por el medio ambiente, el hecho de que analizan una fracción restringida de la total variabilidad existente del genoma estudiado, entre otros. Es por esto que el uso de los marcadores moleculares basados en polimorfismos detectados a nivel del ADN se haya



popularizado enormemente en los últimos años (Arif *et al.*, 2010; Laurentin, 2009; Ortiz *et al.*, 2000). En este contexto, los marcadores pueden ser usados efectivamente para distinguir entre distintos genotipos y, por lo tanto, proveer de herramientas para los derechos de propiedad intelectual de los mejoradores, este es el caso del test de Distinguibilidad, Uniformidad y Estabilidad (DUS), definido por la UPOV. El Criterio DUS se utiliza localmente como dato complementario de los descriptores morfológicos y fisiológicos para el registro de los cultivares, en aquellos casos en que las diferencias entre materiales no son notables. En general, la identificación de un cultivar y la verificación de *pedigree* es importante para la protección de la propiedad intelectual, los ingresos por regalías, y para el desarrollo de las “variedades esencialmente derivadas” .

La información de los perfiles moleculares puede ser utilizada en análisis de relaciones genéticas entre genotipos, como es el caso en el género *Cicer* (Sudupak, 2004) o para inferir relaciones filogenéticas entre especies y géneros estrechamente relacionados (Debeber, 2001); por ejemplo el uso del ADN amplificado arbitrariamente (Arbitrarily Amplified DNA) ha permitido caracterizar cultivares como petunia, crisantemo, geranio y clavel (Caetano-Anollés, 2001).

Entre los marcadores de efectiva utilización para la identificación varietal pueden citarse los ISSR, los cuales presentan la sensibilidad necesaria para distinguir entre individuos genéticamente muy próximos. Pérez de la Torre *et al.* (2003), utilizando 5 iniciadores lograron diferenciar 4 individuos de *Jacaranda* provenientes de semillas de un mismo fruto originado por polinización abierta.

Del mismo modo, la técnica de ISSR fue aplicada satisfactoriamente en la identificación de cultivares como: papa (*Solanum tuberosum* L.) (Prevost y Wilkinson, 1999); arroz (*Oryza sativa* L.) (Bao *et al.*, 2006) y en especies de *Vigna umbellata* (Muthusamy *et al.*, 2008), como así también en especies ornamentales, i.e. crisantemo (*Chrysanthemum*) (Wolff *et al.*, 1995; Yang *et al.*, 2006), *Pandorea* sp (Jain *et al.*, 1999), *Mecardonia* sp. (Pérez de la Torre *et al.*, 2010), *Tabebuia* y *Tecoma* (Ulrich *et al.*, 2009), *Glandularia* (Salvi *et al.*, 2009), *Jacaranda* (Escandón *et al.*, 2005b y Pérez de la Torre *et al.*, 2003) y *Nierembergia linariaefolia* (Escandón *et al.*, 2007b y Pérez de la Torre *et al.*, 2006), en estos últimos, permitió determinar la variabilidad genética en poblaciones de ambos géneros.

Asimismo, han sido utilizados para analizar la distribución geográfica de poblaciones (Sica, 2005; Xue-Jun Ge, 2005), demostrar la estabilidad genética de materiales obtenidos por cultivo *in vitro*, como son los casos de gerbera (*Gerbera jamesonii* Bolus) (Bhatia *et al.*, 2009), *Evolvulus* (Maritano *et al.*, 2009) y *Glandularia* (Vaccaro *et al.*, 2008).

Entre los muchos usos de los microsatélites anclados, podemos mencionar también la identificación de variedades de *Hordeum vulgare* (Fernández *et al.*, 2002), la aplicación en el estudio de poblaciones de *Astragalus oniciformi* (Alexander *et al.*, 2004), de *Lactoris fernandeziana* (Crawford *et al.*, 2001); en *Penstemon* sp (Wolfe *et al.*, 1998) y en estudios taxonómicos del género *Vigna* (Aijibade *et al.*, 2000).

Los ISSR constituyen una técnica reproducible, de una gran simplicidad y economía de manejo, especialmente atractiva debido a que evita la clonación y secuenciación necesarias en los SSR (Gupta y Varshney 2000), y presenta la sensibilidad necesaria par distinguir entre individuos genéticamente muy próximos (Sudupak, 2004; Pérez de la Torre *et al.*, 2003).

---

## 2. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la eficiencia de los ISSR en estudios de diversidad genética en individuos seleccionados del género *Calibrachoa*.

### 2.1. OBJETIVOS PARTICULARES

Optimizar la extracción de ADN para el género *Calibrachoa*.

Optimizar los protocolos de amplificación para cada iniciador estudiado.

Evaluar la potencialidad de los ISSR para determinar el grado de similitud entre los individuos de la colección de *Calibrachoa caesia* del Instituto de Floricultura - CNIA - INTA.

Establecer las relaciones intrapoblacionales e interpoblacionales entre 29 individuos de *C. caesia* agrupados *a priori* según origen geográfico.

---

## 3. HIPÓTESIS DE TRABAJO

Por medio de iniciadores universales basados en motivos de microsatélites, como los ISSR, se puede estudiar la variabilidad genética en la especie *Calibrachoa caesia*. (o en el género *Calibrachoa*???)

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1. MATERIAL VEGETAL

#### 4.1.1. ANÁLISIS PRELIMINAR DE LAS ESPECIES NATIVAS DEL GÉNERO *CALIBRACHOA* MEDIANTE ISSR

El material vegetal utilizado en este análisis preliminar pertenece a la colección del Instituto de Floricultura - CNIA - INTA, el mismo consta de 2 individuos de cada especie, tomados al azar, excepto para *Calibrachoa irgangii* y *Calibrachoa* sp que sólo cuentan con 1 individuo. En la siguiente Tabla (Tabla 4) se indican las zonas de recolección de cada uno de los individuos analizados. Las mapas indicando los lugares de recolección se encuentran en el Anexo I (Figuras 20 a 23).

Especie	Ubicación Geográfica	
	Ejemplar 1	Ejemplar 2
<i>Calibrachoa parviflora</i> (Cpar)	Buenos Aires - CABA - Reserva Ecológica	Buenos Aires - CABA - Reserva Ecológica
<i>Calibrachoa pubescens</i> (Cpub)	Corrientes - San Martín	Corrientes - San Martín
<i>Calibrachoa ovalifolia</i> (Cova)	Corrientes - Concepción	Corrientes - Santo Tomé
<i>Calibrachoa thymifolia</i> (Cthym)	Entre Ríos - Santa Ana	Entre Ríos - La Paz
<i>Calibrachoa excelens</i> (Cexc)	Corrientes - Santo Tomé	Misiones – Candelaria
<i>Calibrachoa missionica</i> (Cmis)	Misiones - Candelaria	Misiones - San Ignacio
<i>Calibrachoa linearis</i> (Clin)	Entre Ríos - Colón	Entre Ríos – Concordia
<i>Calibrachoa pygmaea</i> (Cpyg)	Corrientes - Mercedes	Corrientes - San Martín
<i>Calibrachoa longistila</i> (Clon)	Corrientes - Santo Tomé	Corrientes - Santo Tomé
<i>Calibrachoa caesia</i> (Ccae)	Misiones -Oberá	Misiones -Guaraní
<i>Calibrachoa humilis</i> (Chum)	Corrientes - Mercedes	Corrientes - San Martín
<i>Calibrachoa irgangii</i> (Cirg)	Misiones - Concepción	-
<i>Calibrachoa</i> sp	Misiones - Bdo. de Irigoyen	-

**Tabla 4: Distribución geográfica de las especies de *Calibrachoa* analizadas.**

Se incluyeron para el análisis 2 variedades comerciales de *Calibrachoa* ('White' y 'Dark Blue'), además de 2 controles positivos.

Las plantas fueron cultivadas bajo condiciones estándares de invernáculo en el Instituto de Floricultura - CNIA - INTA (34°36'S, 58°40'W, 26 msm).

#### 4.1.2. COLECCIÓN DE *C. CAESIA*

Los 35 individuos de la especie *C. caesia* identificados como *Ccae1* a *Ccae35* forman parte de la colección del Instituto de Floricultura - CNIA - INTA. Los mismos fueron recolectados en la provincia de Misiones, en los siguientes departamentos (Tabla 5, Figura 3).

Denominación	Departamentos	Latitud	Longitud	Altitud (m)
<b><i>Ccae1</i></b>	San Ignacio	27,250	55,550	197
<b><i>Ccae2</i></b>	Oberá	27,267	55,550	152
<b><i>Ccae3</i></b>	Candelaria	27,391	55,718	186
<b><i>Ccae4</i></b>	Cainguas	27,284	54,934	517
<b><i>Ccae5</i></b>	Cainguas	27,284	54,934	517
<b><i>Ccae6</i></b>	San Ignacio	27,275	55,555	160
<b><i>Ccae7</i></b>	San Ignacio	27,254	55,538	163
<b><i>Ccae8</i></b>	Oberá	27,270	55,550	152
<b><i>Ccae9</i></b>	San Ignacio	27,250	55,550	197
<b><i>Ccae10</i></b>	Oberá	27,270	55,583	152
<b><i>Ccae11</i></b>	Oberá	27,270	55,583	152
<b><i>Ccae12</i></b>	Oberá	27,270	55,550	152
<b><i>Ccae13</i></b>	San Ignacio	27,250	55,550	197
<b><i>Ccae14</i></b>	Guaraní	26,903	54,241	535
<b><i>Ccae15</i></b>	Guaraní	26,903	54,241	535

Denominación	Departamentos	Latitud	Longitud	Altitud (m)
<b>Ccae16</b>	Guaraní	26,903	54,241	535
<b>Ccae17</b>	Guaraní	26,903	54,241	535
<b>Ccae18</b>	Guaraní	26,903	54,241	535
<b>Ccae19</b>	Guaraní	27,210	54,157	360
<b>Ccae20</b>	San Ignacio	27,250	55,550	197
<b>Ccae21</b>	Candelaria	27,391	55,718	186
<b>Ccae22</b>	San Ignacio	27,250	55,550	197
<b>Ccae23</b>	Oberá	27,270	55,567	152
<b>Ccae24</b>	San Ignacio	27,250	55,550	197
<b>Ccae25</b>	Guaraní	26,903	54,241	535
<b>Ccae26</b>	Guaraní	26,903	54,241	535
<b>Ccae27</b>	Guaraní	27,210	54,157	360
<b>Ccae28</b>	Guaraní	27,210	54,157	360
<b>Ccae29</b>	San Ignacio	27,250	55,550	197
<b>Ccae30</b>	Oberá	27,270	55,550	152
<b>Ccae31</b>	Oberá	27,270	55,550	152
<b>Ccae32</b>	Oberá	27,270	55,570	152
<b>Ccae33</b>	Oberá	27,270	55,580	152
<b>Ccae34</b>	San Pedro	26,838	54,348	592
<b>Ccae35</b>	San Pedro	26,838	54,348	592

**Tabla 5: Distribución geográfica de los 35 individuos de *C. caesia* analizados.**

Se incluyeron, además, un control positivo (+) y un individuo de *Tecoma* -Victoria INTA-JICA- (*Vic*) *Bignoniaceae*, como fuera de grupo.

Las plantas fueron cultivadas bajo condiciones estándares de invernáculo en el Instituto de Floricultura - CNIA - INTA (34°36'S, 58°40'W, 26 msm).

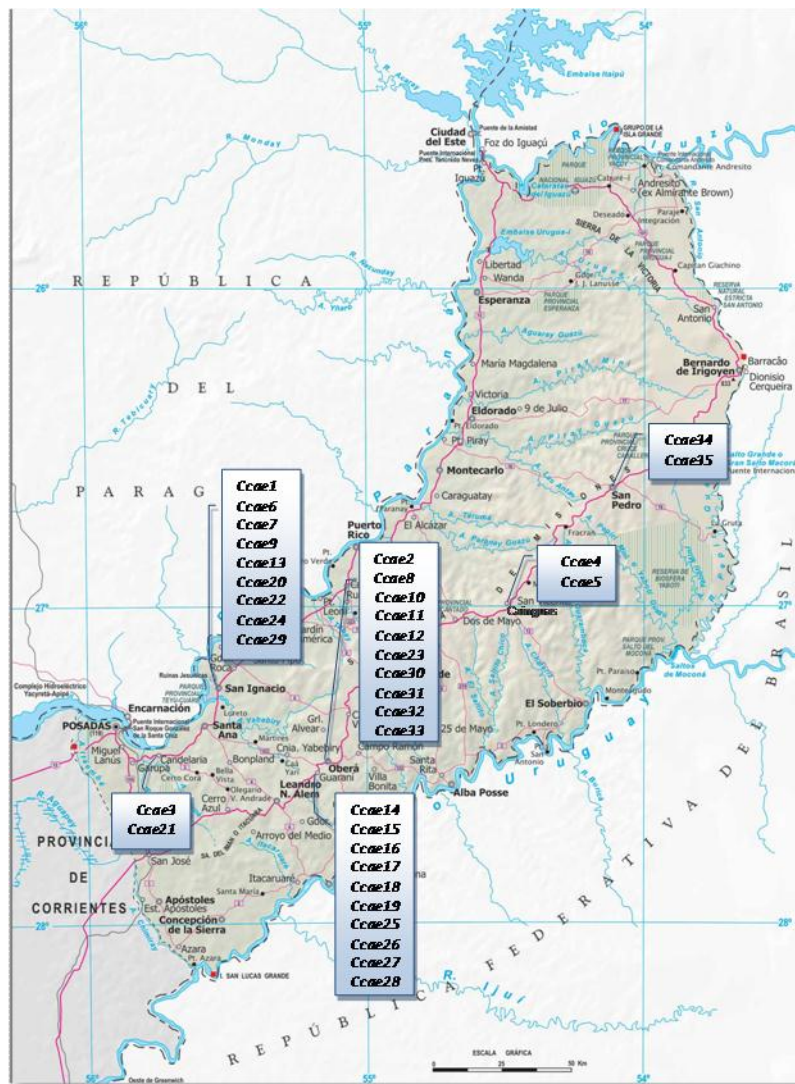


Figura 3: Ubicación geográfica de los individuos de *C. caesia* analizados. Provincia de Misiones, Argentina.

## 4.2. EXTRACCIÓN, PURIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ADN

El ADN total se extrajo a partir de 30-40 mg de hojas jóvenes liofilizadas siguiendo el protocolo de Pérez de la Torre, *et al.* (2010) dejando actuar el *buffer* CTAB durante 2 Hs a 65°C en agitación constante.

Las proteínas y restos de componentes celulares se eliminaron por adición de cloroformo:octanol (24:1) y posterior precipitación con isopropanol frío y centrifugación a 4°C, recuperando el sobrenadante.

El ARN fue removido por digestión con la enzima Ribonucleasa pancreática bovina tipo I-A (0,1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) (Sigma). Las impurezas remanentes fueron extraídas con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1), y los restos de fenol fueron eliminados con cloroformo:octanol (24:1). El ADN presente en el sobrenadante fue reprecipitado con isopropanol frío, Cloruro de Sodio 5M (5%) y centrifugación a 4°C.

Luego de 2 lavados con etanol 70%, el pellet obtenido se resuspendió en cantidad suficiente de *buffer* TE 1X hasta su disolución total (Ver protocolo completo en Anexo IV).

Las muestras de ADN se conservaron a -20°C.

La concentración y pureza del ADN obtenido se cuantificó por comparación con el marcador de peso molecular  $\lambda$  cortado con la enzima *Hind* III (Pb-L, UNQ) en un gel de agarosa (TAE 1X) al 0,8% teñido con bromuro de etidio (0,01 mg/mL).

### 4.3. AMPLIFICACIÓN DEL ADN

Se utilizaron 13 iniciadores ISSR (Tabla 6), descriptos por la UBC, Jain *et al.*, (1999) y Blair *et al.*, (1999).

Iniciador	Secuencia (5'-3')	Referencia
5'CT	CCCGGATCC(CT) <sub>9</sub>	Blair <i>et al.</i> 1999
5'CA	CCCGGATCC(CA) <sub>9</sub>	Blair <i>et al.</i> 1999
5'GT	CCCGGATCC(GT) <sub>9</sub>	Blair <i>et al.</i> 1999
5'GA	CCCGGATCC(GA) <sub>9</sub>	Blair, <i>et al.</i> 1999
5'GACA	TC(GACA) <sub>4</sub>	Jain <i>et al.</i> 1999
3'CAC	(CAC) <sub>5</sub> GT	Jain <i>et al.</i> 1999
3'CAG	(CAG) <sub>5</sub> AT	Jain <i>et al.</i> 1999
3'GGG	GGG(TGGGG) <sub>2</sub> G	UBC
3'GA	(GA) <sub>9</sub> T	Blair <i>et al.</i> 1999
3'AG	(AG) <sub>8</sub> C	UBC
3'AC	(AC) <sub>8</sub> G	UBC
3'TG	(TG) <sub>8</sub> A	UBC



Iniciador	Secuencia (5'-3')	Referencia
3'TC	(TC) <sub>8</sub> A	UBC

**Tabla 6: Iniciadores ISSR utilizados en las reacciones de PCR.**

#### 4.3.1. AJUSTE DE LAS CONDICIONES DE REACCIÓN

Las reacciones de amplificación, para cada iniciador, se llevaron a cabo con 3mM de Cloruro de Magnesio, utilizando gradientes de temperatura a fin de encontrar las temperaturas óptimas de hibridación. Los gradientes de 5 temperaturas descendentes se tomaron teniendo en cuenta las temperaturas utilizadas en trabajos previos del laboratorio con los mismos iniciadores (Escandón *et al.*, 2005c).

#### 4.3.2. CONDICIONES DE REACCIÓN

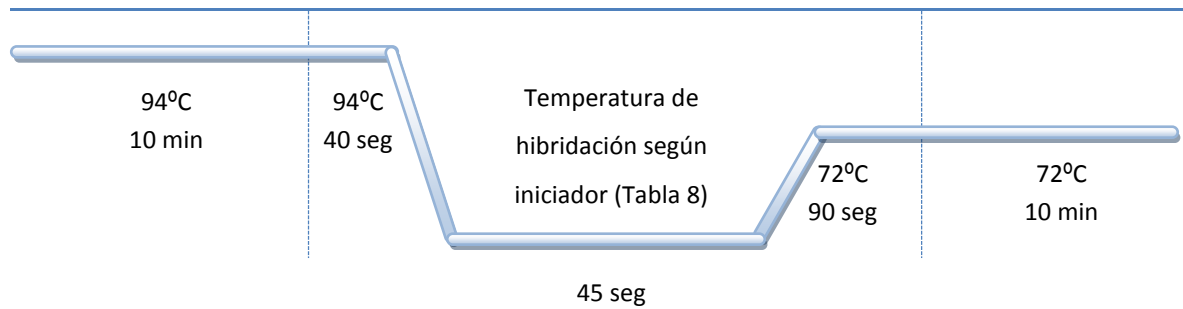
Las reacciones de PCR se prepararon en un volumen final de 25 µl, conteniendo los siguientes componentes (Tabla 7).

Reactivo	Cantidad
H <sub>2</sub> O u.p.	12,4 µL
Buffer de reacción 10X (Inbio Highway)	2,5 µL
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)(Inbio Highway)	3,0 µL
Mix de dNTPs (1,25 mM de c/u) (Inbio Highway)	4,0 µL
Iniciador (20 µM) (Qiagen Operon)	1,0 µL
Taq polimerasa (5U/µL) (Inbio Highway)	0,1 µL
ADN (15 ng/µL)	2,0 µL

**Tabla 7: Componentes de la mezcla de reacción.**

Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador BioRad (My Cycler), bajo las condiciones de amplificación que se muestran esquemáticamente en la Figura 4.





**Figura 4:** Esquema del programa utilizado en el termociclador My Cycler de BioRad.

Los productos de PCR se verificaron en un gel de agarosa-TAE 1X al 2,5%, cargando 10  $\mu$ L de una mezcla que contiene 8  $\mu$ L del producto de reacción y 2  $\mu$ L de *buffer* de siembra 3X (Azul de bromofenol 0,25%, Glicerol 50%, Tris-HCl 10mM, pH: 7,5, EDTA 50 mM. Biodynamics) , los gels fueron teñidos con bromuro de etidio (0,05 mg/mL), corridos a 120 volt por 260 min y documentados con el sistema de fotografía DocIt<sup>®</sup> de UVP. Las bandas obtenidas fueron estimadas (en pares de bases -pb-) por comparación con el marcador de peso molecular 100 bp (PB-L, UNQ).

Para evaluar la reproducibilidad del perfil de bandas obtenido, tanto la extracción de ADN como las reacciones de PCR se efectuaron 3 veces. Para el análisis sólo se consideraron aquellas bandas claramente definidas, independientemente de su intensidad. Las bandas con igual migración fueron consideradas como fragmentos idénticos. El análisis de los perfiles de amplificación se realizó visualmente, los tamaños de cada uno de los fragmentos se determinaron manualmente, con ayuda del soporte bioinformático “Gel-Pro Analyzer” versión 3.1 (Media Cybernetics).

#### 4.4. ANÁLISIS DE LOS DATOS MOLECULARES

Cada fragmento amplificado se consideró como un alelo dominante para cada *locus*, codificando su presencia o ausencia como 1 ó 0, respectivamente, permitiendo la generación del perfil de identificación molecular para cada individuo. La matriz binaria de datos resultante del análisis se utilizó para calcular las similitudes genéticas en base al coeficiente de Concordancia Simple,  $SM = (a+d)/(a+b+c+d)$ , donde *a* es el número de bandas presentes tanto en *i* como en *j*, *b* es el número de bandas presentes en *i* y ausentes en *j*, *c* es el número de bandas presentes en *j* y ausentes en *i* y *d* es el número de bandas ausentes tanto en *i* como en *j*, entre todos los posibles pares de entradas. La matriz de similitud generada fue analizada siguiendo el método UPGMA, un algoritmo jerárquico que agrupa a las OTUs en grupos similares, teniendo en cuenta las distancias geométricas promedio entre ellas, el resultado de este procedimiento se graficó en un dendrograma.

Todos los datos fueron generados por el programa NTSYS-PC vs. 2.02 (Rohlf, 1998).

Posteriormente, la asociación entre la matriz de similitud y la obtenida del dendrograma se evaluó con el test de Mantel (1967) utilizando 1000 permutaciones aleatorias con el software NTSYS-PC vs. 2.02.

#### 4.5. ANÁLISIS DE LOS ESTADÍSTICOS

El poder de discriminación de cada iniciador ISSR fue evaluado a fin de caracterizar su capacidad para detectar *loci* polimórficos entre los genotipos analizados, para lo cual se calcularon los siguientes parámetros: porcentaje de polimorfismo (%P), índice de diversidad genética o contenido de información polimórfica (PIC), índice de Shannon ( $H'$ ), "marker index" (MI), Resolving Power ( $R_p$ ) y heterocigosidad esperada imparcial ( $U_{He}$ ).

Los estadísticos básicos por iniciador, como el número promedio de *loci* y porcentaje de *loci* polimórficos, se obtuvieron de las frecuencias alélicas con el programa Excel 2007; mientras que los obtenidos por individuo y por población fueron calculados con los programas GenAEx 6.4 (Peakall y Smouse, 2006) y TFPGA 1.3 (Miller, 1997).

Los estimadores de diversidad genética PIC,  $U_{He}$ ,  $H'$ , también se calcularon para cada *locus* usando el programa GenAEx 6.4. El MI se calculó de los datos generados por este último con el programa Excel 2007.

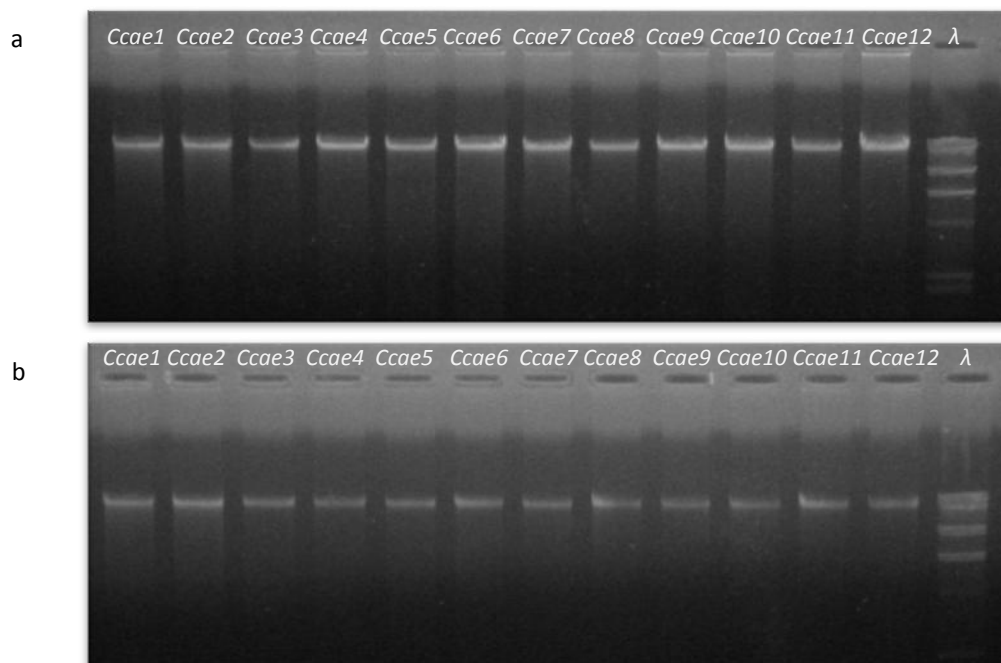
El análisis molecular de la varianza (AMOVA) basado en 1023 permutaciones, calculado mediante el programa Arlequín 3.5.1.2 (Excoffier y Lischer, 2010), fue usado para evaluar la varianza entre y dentro de las poblaciones, definidas éstas, por los departamentos en los cuales los individuos fueron recolectados (sólo se tuvo en cuenta para el análisis los departamentos de Guaraní, Oberá y San Ignacio), se calculó, además el coeficiente de fijación  $F_{st}$  el cual muestra el grado de diferenciación genética entre las poblaciones, en función de sus frecuencias alélicas. El gráfico resultante se obtuvo mediante el programa GenAEx 6.4.

El análisis de coordenadas principales (PCoA) se calculó mediante el programa GenAEx 6.4.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. EXTRACCIÓN DE ADN

Como resultado del protocolo de extracción utilizado, se obtuvo cantidad y calidad adecuada de ADN (Figura 5), necesarias para las reacciones de amplificación. A partir de las concentraciones obtenidas se realizaron diluciones a fin de lograr las concentraciones óptimas para las reacciones de PCR, a modo de ejemplo se presentan las Figuras 5a y b.



**Figura 5:** Corrida electroforética del ADN extraído de 12 individuos de *Calibrachoa*, por el método de CTAB modificado. Por calle se sembraron 2  $\mu$ L de ADN, 2  $\mu$ L de *buffer* de siembra y 6  $\mu$ L de TE 1X.  $\lambda$ : Marcador de peso molecular  $\lambda$ /*Hind* III 100 ng/ $\mu$ L, sembrados 2  $\mu$ L. Condiciones de corrida: 100V/60 min a) ADN stock; b) ADN diluído.

### 5.2. CONDICIONES DE PCR

Los resultados de la evaluación de los gradientes de temperatura de hibridación para cada uno de los iniciadores se resumen en la Tabla 8. La Figura 6 muestra, a modo de ejemplo, la corrida electroforética de los iniciadores 5'CT y 5'GT. La elección de cada condición se realizó en función del patrón de bandas obtenido.

Iniciador	Secuencia (5'-3')	T°
5'CT	CCCGGATCC(CT) <sub>9</sub>	57
5'CA	CCCGGATCC(CA) <sub>9</sub>	57
5'GT	CCCGGATCC(GT) <sub>9</sub>	57
5'GA	CCCGGATCC(GA) <sub>9</sub>	60
5'GACA	TC(GACA) <sub>4</sub>	52
3'CAC	(CAC) <sub>5</sub> GT	57
3'CAG	(CAG) <sub>5</sub> AT	55
3'GGG	GGG(TGGGG) <sub>2</sub> G	60
3'GA	(GA) <sub>9</sub> T	57
3'AG	(AG) <sub>8</sub> C	53
3'AC	(AC) <sub>8</sub> G	53
3'TG	(TG) <sub>8</sub> A	51
3'TC	(TC) <sub>8</sub> A	50

Tabla 8: Temperaturas de hibridación óptimas para los iniciadores estudiados. (T°: Temperatura)

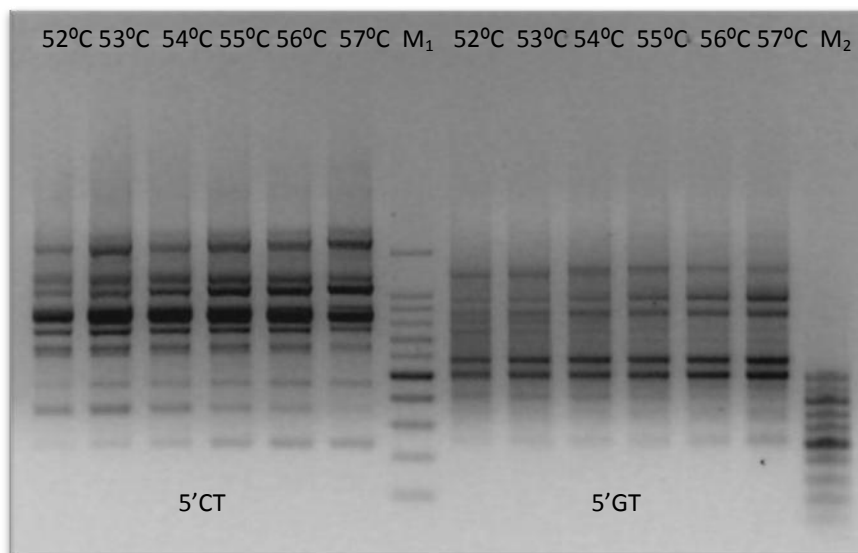


Figura 6: Evaluación de las temperaturas de hibridación óptimas. Se ejemplifica la optimización para los iniciadores 5'CT y 5'GT. (M<sub>1</sub>: Marcador de peso molecular 100 bp, M<sub>2</sub>: Marcador de peso molecular 50 bp)

### 5.3. ANÁLISIS PRELIMINAR DE LAS ESPECIES NATIVAS DEL GÉNERO *CALIBRACHOA* MEDIANTE ISSR

Se llevó a cabo un análisis preliminar de las 13 especies nativas del género, a fin de determinar las condiciones de ensayo para los ISSR estudiados de manera de contar con información para futuros análisis de especie.

Las Figuras 7 y 8 muestran, a modo de ejemplo, los perfiles de bandas obtenidos de los individuos nativos del género *Calibrachoa*.

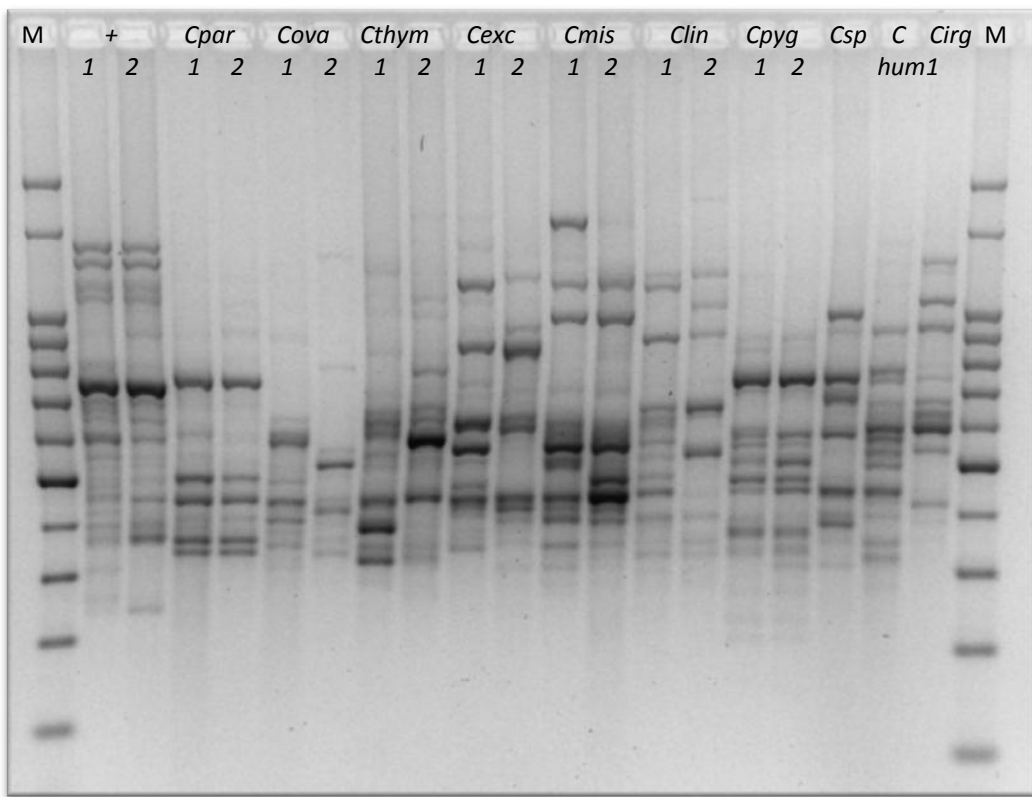
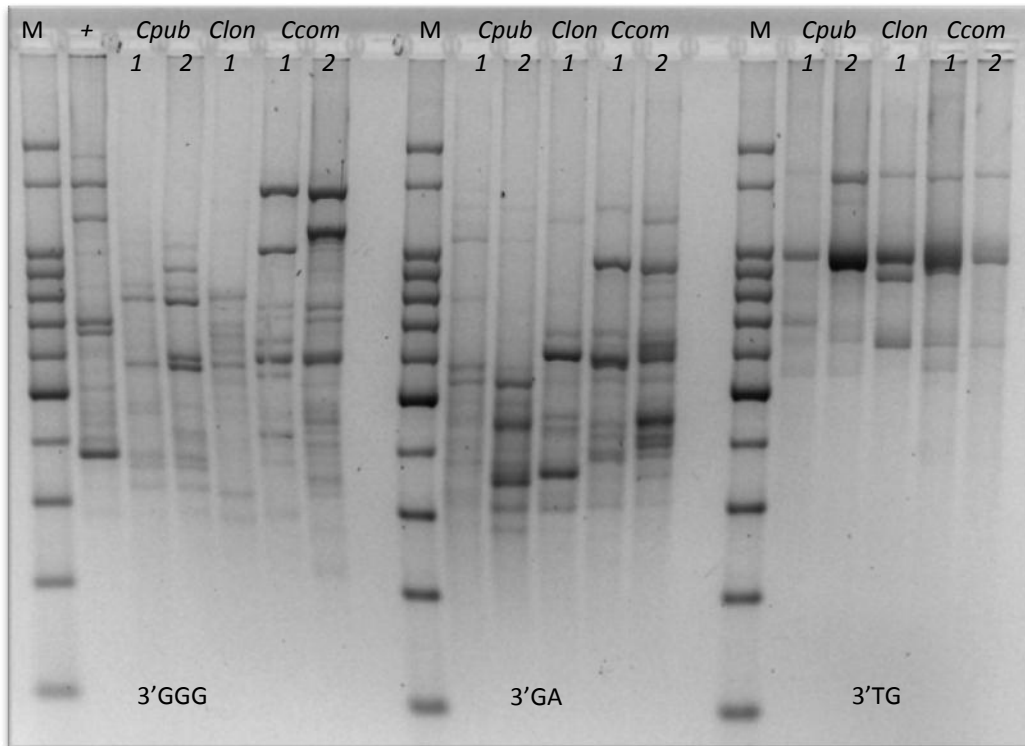


Figura 7: Perfil de amplificación de los individuos *Calibrachoa* con el iniciador 3'GA. (M: Marcador de peso molecular 100 pb. +: control positivo).

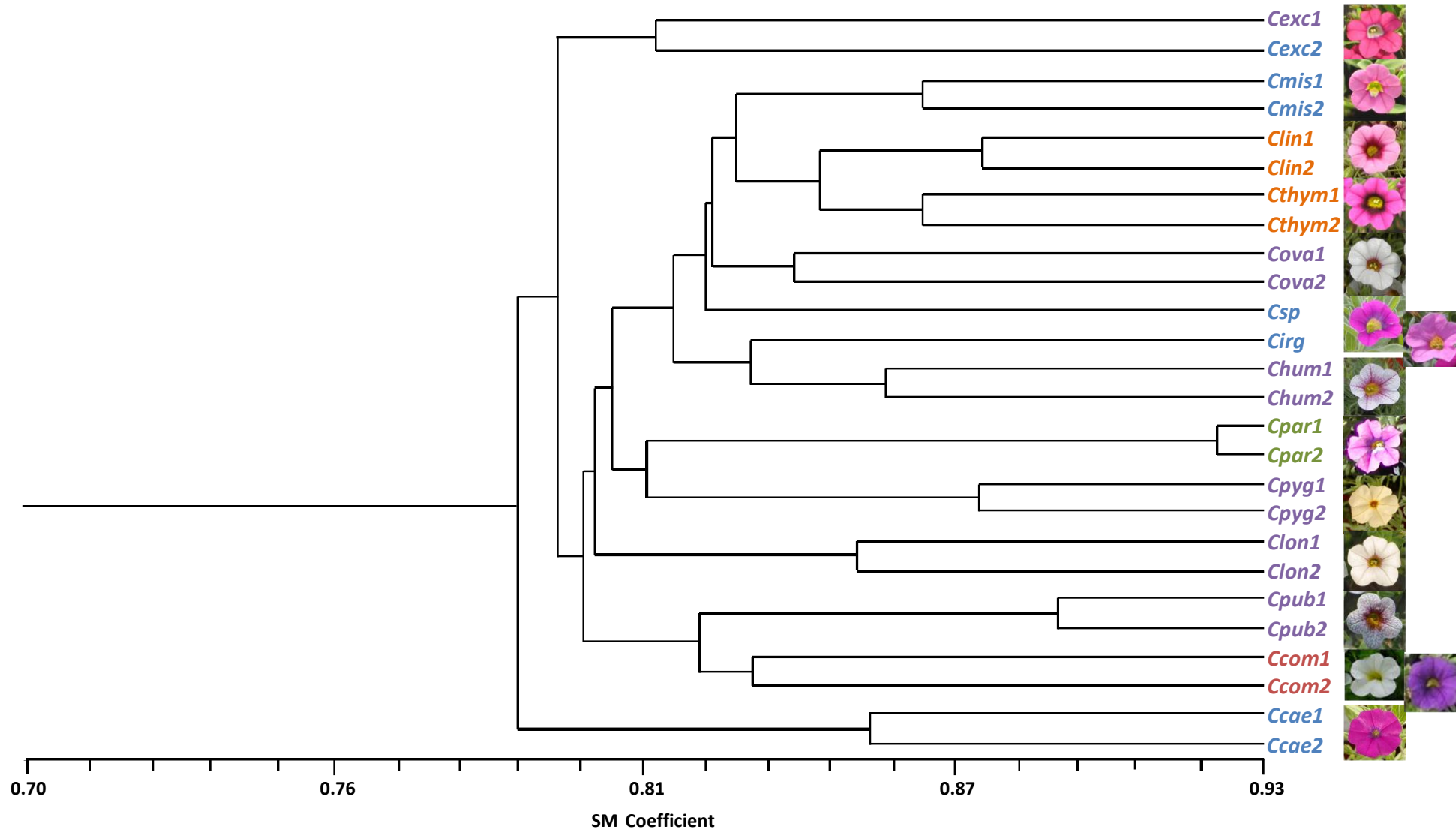


**Figura 8:** Perfil de amplificación de los individuos *Calibrachoa* con los iniciadores 3'GGG, 3'GA y 3'TG. (M: Marcador de peso molecular 100 pb. +: control positivo).

Los 13 iniciadores utilizados revelaron un total de 1245 *loci*, con un 100% de polimorfismo, y un promedio de 95,77 *loci* por iniciador.

El dendrograma obtenido mediante el coeficiente de SM y el agrupamiento UPGMA, se muestra en la Figura 9. El coeficiente de correlación cofenética registró un valor  $r = 0.80386$  ( $p[\text{random } Z \geq \text{observed } Z] = 0.0020$ ), entre la matriz de similitud y la matriz derivada del fenograma, lo que sugiere un buen ajuste de agrupamiento.

El análisis del dendrograma generado muestra a los 2 individuos de cada especie del género agrupados juntos, aún aquellos individuos que se encontraban en distintas provincias. Las especies de *C. linearis* y *C. thymifolia* conforman un pequeño grupo diferenciable, al igual que *C. pygmaea* y *C. parviflora*. Los 2 individuos de *Calibrachoa* comerciales, se agrupan a la altura de 0,8367 (Figura 9, Anexo II: Tabla 18), mientras que el nodo de las *C. excelens* y *C. caesia* lo hacen a 0,8022 y 0,7950, respectivamente. *Calibrachoa* sp se une en 0,8284, en forma aislada al grupo conformado por las especies de *C. misionica*, *C. linearis*, *C. thymifolia* y *C. ovalifolia*. Los valores de similitud oscilan entre 0,9187 para el núcleo de *C. parviflora* y 0,7894 para *C. caesia*, último núcleo en agruparse (Anexo II: Tabla 18).



**Figura 9:** Dendrograma obtenido de las especies de *Calibrachoa* con el coeficiente SM, según el agrupamiento UPGMA. Texto en Azul: Provincia de Misiones, Lila: Corrientes, Naranja: Entre Ríos, Verde: Buenos Aires, Rojo: Variedades comerciales.

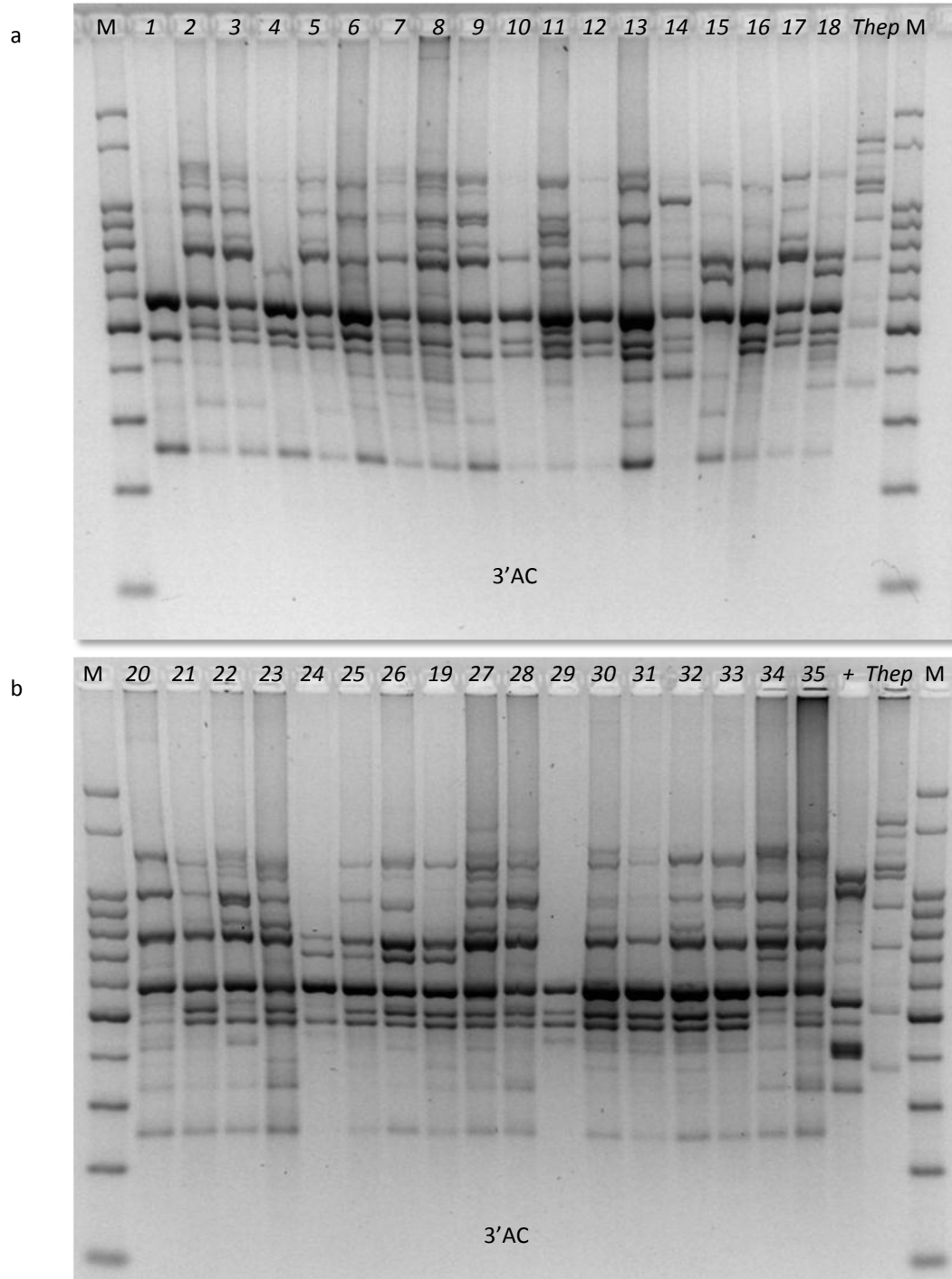




## 5.4. COLECCIÓN DE *C. CAESIA*

### 5.4.1. PERFILES DE AMPLIFICACIÓN

Las Figuras 10 a 12 muestran, a modo de ejemplo, las corridas electroforéticas de los individuos de la colección de *C. caesia* analizada.



**Figura 10 a y b:** Perfil de amplificación de los individuos de *C. caesia* con el iniciador 3'AC. (+: Control positivo, M: Marcador de peso molecular 100 pb).

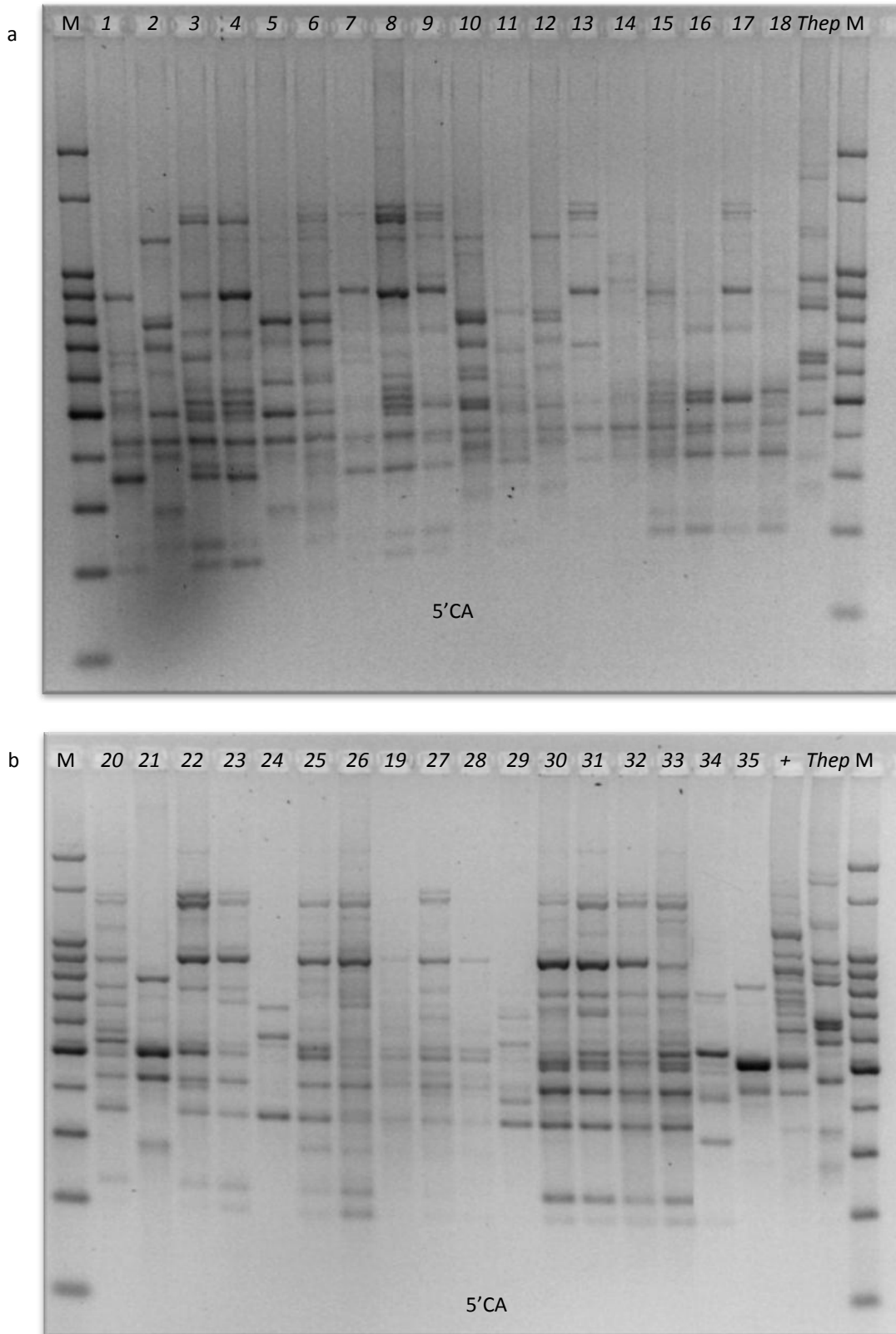


Figura 11 a y b: Perfil de amplificación de los individuos de *C. caesia* con el iniciador 5'CA. (+: Control positivo, M: Marcador de peso molecular 100 pb).

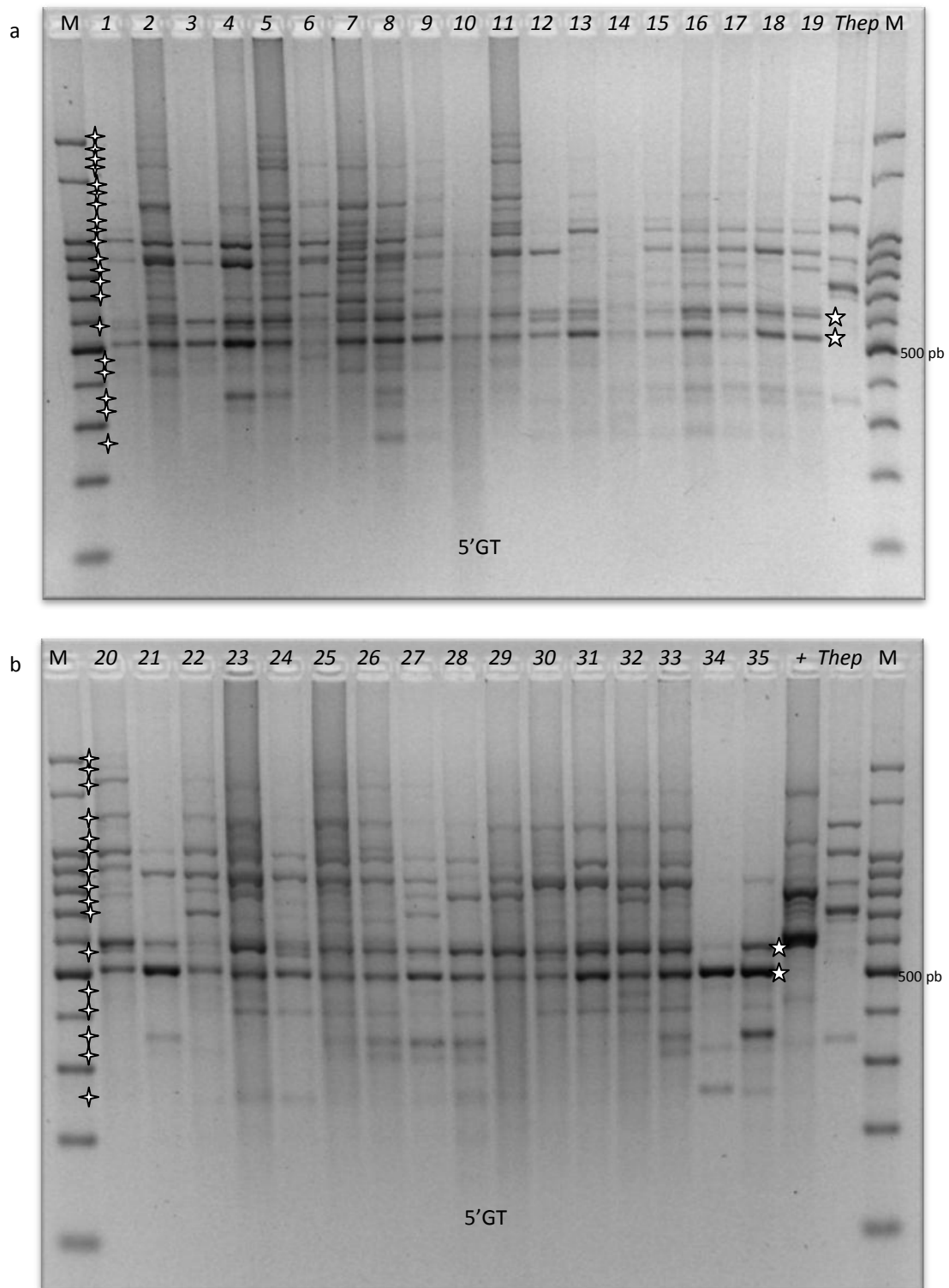


Figura 12 a y b: Perfil de amplificación de los individuos de *C. caesia* con el iniciador 5'GT. ☆: *loci* monomórficos. ✧: ejemplos de *loci* polimórficos (+: Control positivo, M: Marcador de peso molecular 100 pb).

## 5.4.2. ANÁLISIS DE DATOS MOLECULARES

El dendrograma (Figura 14) muestra los niveles de agrupación de los 35 individuos de *C. caesia* estudiados, Victoria INTA-JICA, utilizado como fuera de grupo, se agrupó en último término a 0,6661 (Tabla 9).

El análisis del árbol muestra 2 grandes grupos, denominados A y B en la Figura 14, conformados por varios subgrupos menores.

El grupo A está constituido por los individuos *Ccae1*, *Ccae2*, *Ccae3*, *Ccae4*, *Ccae5*, *Ccae6*, *Ccae7*, *Ccae8*, *Ccae9*, *Ccae10*, *Ccae12*, *Ccae13*, *Ccae15*, *Ccae16*, *Ccae17*, *Ccae20*, *Ccae21*, *Ccae22*, *Ccae24* y *Ccae29*. De éstos, los individuos *Ccae1*, *Ccae6*, *Ccae7* y *Ccae13* forman el subgrupo  $A_3$  (0,8521), a los que se les une en 0,8414 (Tabla 9) el nodo  $A_4$ , formado por los individuos *Ccae2*, *Ccae21*, *Ccae10* y *Ccae12*. Los individuos *Ccae3*, *Ccae4* y *Ccae5* (subgrupo  $A_5$ , nivel de unión en 0,8549) se agrupan en 0,8356 al nodo formado por los grupos  $A_3$  y  $A_4$ , formando así el *cluster* principal ( $A_1$ ) del grupo A. El grupo  $A_2$ , reúne a los subgrupos  $A_6$  y  $A_7$  y al individuo *Ccae8*. El subgrupo  $A_6$ , formado por el núcleo de los individuos *Ccae9*, *Ccae22* y el subgrupo de *Ccae15*, *Ccae16* y *Ccae17* tiene un nivel de unión en 0,8287. En 0,8148 se incorpora el individuo *Ccae8*, mientras que el último nodo ( $A_7$ ) en completar el grupo A, conformado por los individuos *Ccae20*, *Ccae24* y *Ccae29*, lo hace a la altura de 0,8073 (Figura 14, Tabla 9).

Dentro del grupo B pueden distinguirse 2 subgrupos, B1 y B2, constituidos por los individuos *Ccae18*, *Ccae19*, *Ccae25*, *Ccae26*, *Ccae27* y *Ccae28*, el primero (nivel de unión en 0,8235), mientras que B2 involucra a los individuos *Ccae23*, *Ccae30*, *Ccae31*, *Ccae32* y *Ccae33* (0,8253).

La unión de los grupos A y B se produce a la altura de 0,8043; el individuo *Ccae14* se une en forma aislada en 0,7839, mientras que el núcleo C formado por los individuos *Ccae34* y *Ccae35* lo hace a 0,7829, finalmente el último individuo en incorporarse (*Ccae11*), lo hace en 0,7665 (Figura 14, Tabla 9).

OTU	Nivel	OTU	Nivel	OTU	Nivel	OTU	Nivel
<b>Ccae1</b>	0,8718	<b>Ccae4</b>	0,8742	<b>Ccae24</b>	0,8339	<b>Ccae30</b>	0,8875
<b>Ccae6</b>	0,8815	<b>Ccae5</b>	0,8220	<b>Ccae29</b>	0,8043	<b>Ccae31</b>	0,8688
<b>Ccae7</b>	0,8521	<b>Ccae9</b>	0,8501	<b>Ccae18</b>	0,8489	<b>Ccae32</b>	0,8779
<b>Ccae13</b>	0,8414	<b>Ccae22</b>	0,8287	<b>Ccae19</b>	0,8235	<b>Ccae33</b>	0,7839
<b>Ccae2</b>	0,8561	<b>Ccae15</b>	0,8519	<b>Ccae25</b>	0,8658	<b>Ccae14</b>	0,7829
<b>Ccae21</b>	0,8489	<b>Ccae16</b>	0,8730	<b>Ccae26</b>	0,8289	<b>Ccae34</b>	0,8573
<b>Ccae10</b>	0,8706	<b>Ccae17</b>	0,8148	<b>Ccae27</b>	0,8549	<b>Ccae35</b>	0,7665
<b>Ccae12</b>	0,8356	<b>Ccae8</b>	0,8073	<b>Ccae28</b>	0,8081	<b>Ccae11</b>	0,6659
<b>Ccae3</b>	0,8549	<b>Ccae20</b>	0,8115	<b>Ccae23</b>	0,8253	<b>Vic</b>	---

Tabla 9: Niveles de unión del dendrograma obtenido de los individuos de *C. caesia*.

El coeficiente de correlación cofenética  $r$ , muestra un valor de 0,91586 ( $p[\text{random } Z \geq \text{observed } Z] = 0.0020$ ), sugiriendo una muy buena correlación entre la matriz de similitud y aquella generada a partir del dendrograma (Figura 13).

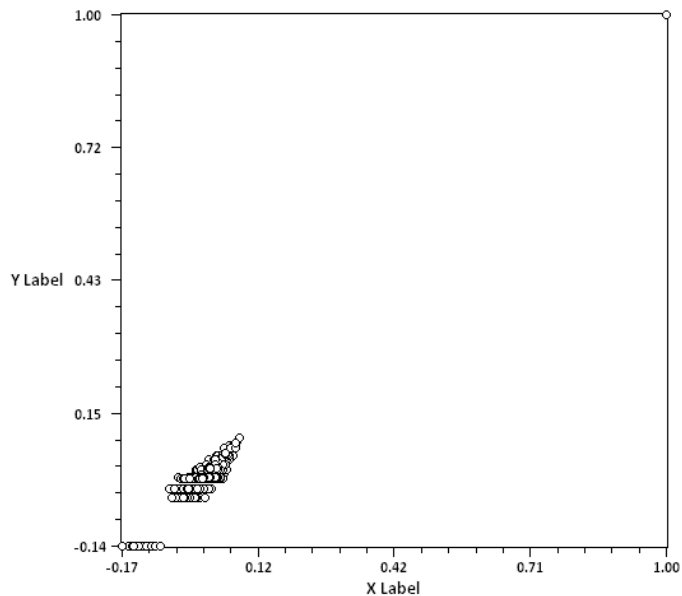


Figura 13: Gráfico de correlación cofenética.

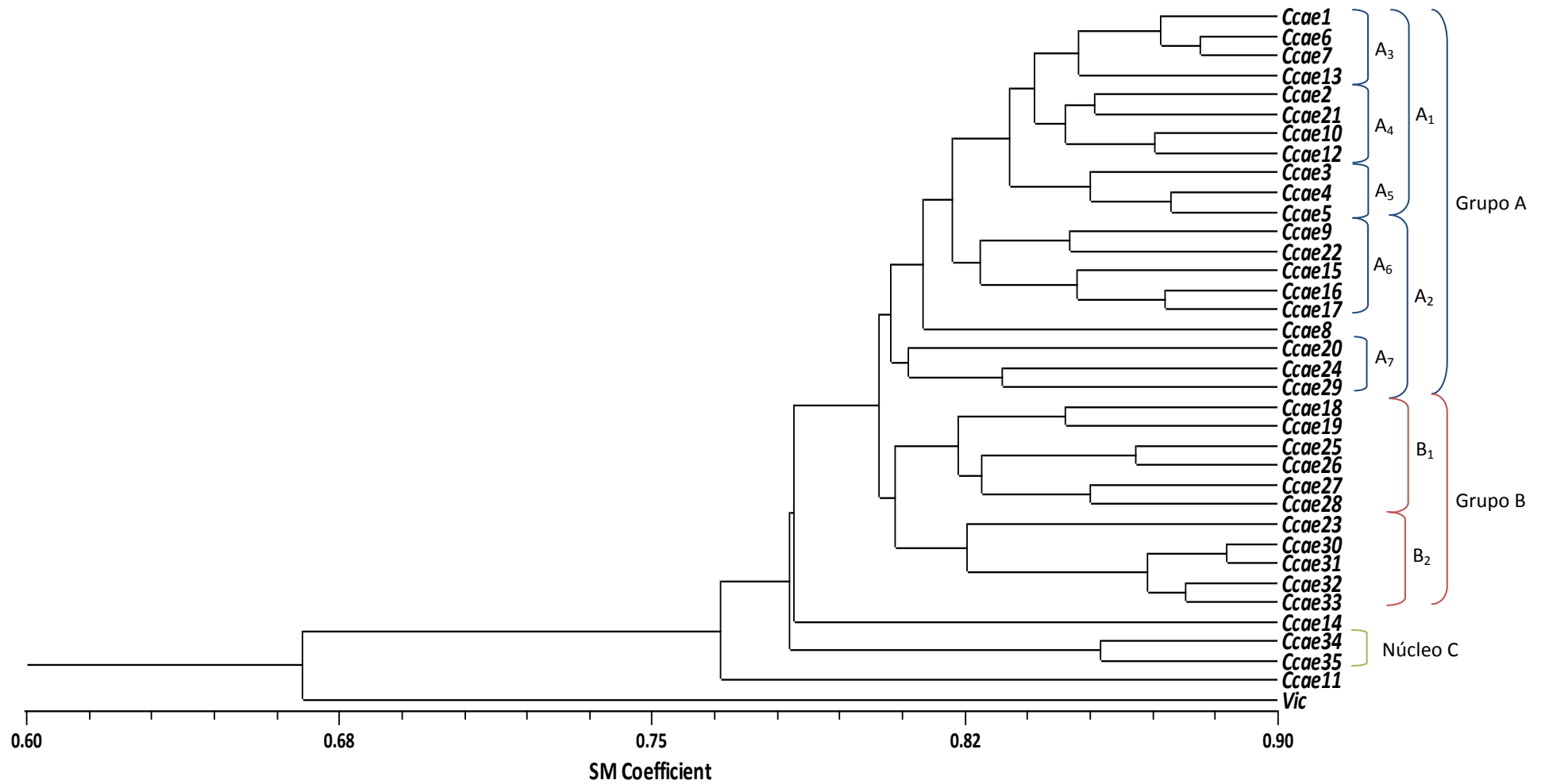


Figura 14: Dendrograma obtenido mediante el coeficiente SM, según el agrupamiento UPGMA de los 35 individuos de la colección de *C. caesia* estudiada.

### 5.4.3. ANÁLISIS DE LOS ESTADÍSTICOS

Con los 13 iniciadores utilizados se generaron un total de 701 *loci*, con un porcentaje de *loci* polimórficos del 98%. Se obtuvieron en promedio 54 *loci* por iniciador, 53 de ellos polimórficos.

La Tabla 10 resume los datos obtenidos por iniciador de los individuos analizados: número de *loci* totales (LT), porcentaje de polimorfismo (%P), Rp, MI, H', PIC y UHe.

Iniciador	Nº de <i>loci</i> amplificados			%P	Rp	MI	H'	PIC	Uhe
	LT	LM	LP						
5'CT	40	0	40	100,00	14,80	9,24	0,367	0,231	0,234
5'CA	63	0	63	100,00	20,34	10,80	0,291	0,172	0,174
5'GT	46	2	44	95,65	17,49	8,26	0,315	0,188	0,190
5'GA	71	0	71	100,00	22,34	10,90	0,266	0,153	0,155
5'GACA	65	0	65	100,00	23,20	11,70	0,302	0,180	0,182
3'CAC	49	0	49	100,00	11,83	7,62	0,258	0,155	0,158
3'CAG	55	4	51	92,73	13,71	6,37	0,269	0,125	0,161
3'GGG	63	1	62	98,41	21,77	11,70	0,312	0,188	0,191
3'GA	56	1	55	98,21	18,51	10,30	0,309	0,188	0,190
3'AG	47	2	45	95,74	10,29	7,41	0,273	0,165	0,167
3'AC	45	4	41	91,11	14,17	6,79	0,279	0,166	0,168
3'TG	56	0	56	100,00	10,51	5,87	0,196	0,105	0,106
3'TC	45	0	45	100,00	12,29	5,95	0,236	0,132	0,134
<b>Total</b>	<b>701</b>	<b>14</b>	<b>687</b>						
<b>Promedio</b>	<b>53,92</b>	<b>1,08</b>	<b>52,85</b>	<b>98,00</b>			<b>0,278</b>	<b>0,164</b>	<b>0,167</b>
<b>SE</b>							<b>0,008</b>	<b>0,006</b>	<b>0,006</b>

**Tabla 10:** Resultados de los estimadores de diversidad genética de los individuos de *Calibrachoa*. LT: *loci* totales; LM: *loci* monomórficos; LP: *loci* polimórficos; %P: Porcentaje de polimorfismo; Rp: Resolving Power; MI: Marker Index; H': Índice de Shannon; PIC: Contenido de información polimórfica o índice de diversidad; UHe: Heterocigosidad esperada imparcial. SE: error estándar.



Los porcentajes de polimorfismo, por iniciador, oscilaron entre un 100 % para 5'GA, 5'CA, 3'TC, 3'CAC y 3'TG y un 91,11% para 3'AC. Los valores máximos de Rp fueron para los iniciadores 5'GACA y 5'GA (23,20 y 22,34, respectivamente), mientras que los menores valores fueron para los iniciadores 3'AG y 3'TG (10,29 y 10,51, respectivamente). Los valores de MI variaron de 11,69 para el iniciador 3'GACA a 5,87 para 3'TG.

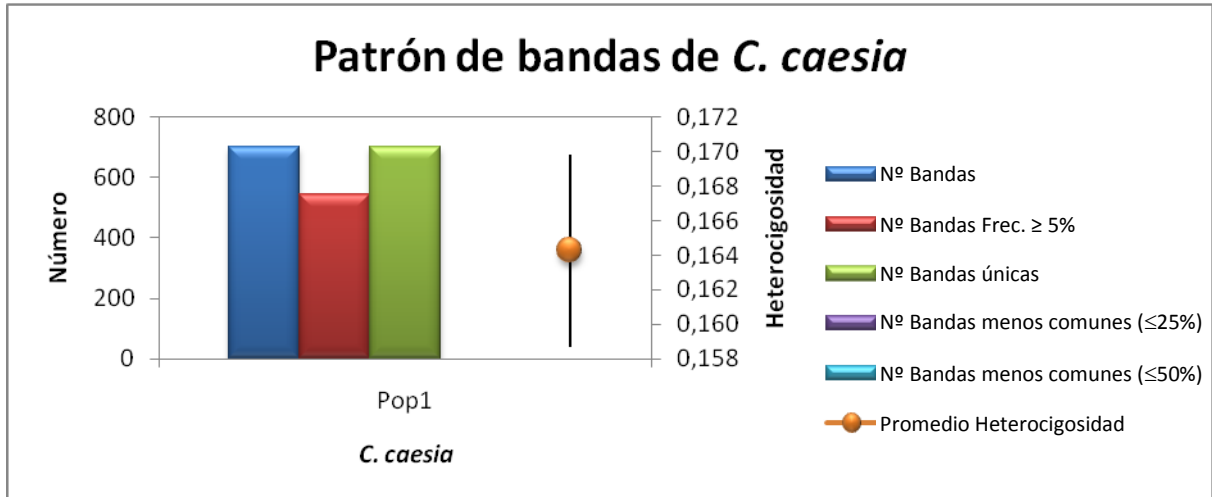
El mayor valor promedio de diversidad genética (PIC) fue de 0,231 para 5'CT y el menor de 0,105 para 3'TG, con un promedio para todos los iniciadores de 0,164, variando por *locus* de 0 para los *locus* monomórficos a 0,500 (Anexo III: Tabla 19); mientras que el valor máximo del índice de Shannon fue para el iniciador 3'GA (0,596) y el menor para 3'TG (0,196), con un promedio de 0,278 para todos los iniciadores estudiados (Tabla 10).

Los iniciadores más informativos, con un 100% de polimorfismo, resultaron ser 5'GACA, 5'GA, 5'CA y 5'CT, y los anclados en 3': 3'CAC, 3'TC y 3'TG, teniendo en cuenta al %P, Rp y al MI como criterios de prioridad para el ordenamiento; siendo los menos informativos, manteniendo este mismo criterio, los iniciadores 3'AC y 3'CAG, con porcentajes de polimorfismo menores al 95% (Tabla 10).

Los datos obtenidos del patrón de bandas de los individuos de *C. caesia* se indican en la Tabla 11, la Figura 15 representa el gráfico derivado de la misma.

Patrón total de bandas	
Nº Bandas	701
Nº Bandas Frec. >= 5%	542
Nº Bandas menos comunes (<=25%)	0
Nº Bandas menos comunes (<=50%)	0
Promedio PIC	0,164
SE del promedio PIC	0,006
Promedio UHe	0,167
SE del promedio UHe	0,006

**Tabla 11:** Patrón de bandas de la población total de *C. caesia*. (GenAlEx 6.4). Nº Bandas Frec. >= 5%: Número de bandas con frecuencia  $\geq 5\%$ . Nº Bandas menos comunes (<=25%): Número de bandas menos comunes (Frecuencia  $\leq 25\%$ ) encontrada en 25% o menos de las poblaciones; Nº Bandas menos comunes (<=50%): Número de bandas menos comunes (Frecuencia  $\leq 50\%$ ) encontrada en 50% o menos de las poblaciones; PIC: Diversidad genética/contenido de información polimórfica; UHe: Heterocigosidad esperada imparcial. SE: error estándar. Se asume el equilibrio de Hardy-Weinberg para datos binarios diploides.



**Figura 15:** Gráfico del patrón de bandas obtenido de la población total de *C. caesia* derivado de la Tabla 9.

La Tabla 12 resume los datos promedio de bandas polimórficas según los motivos de repetición nucleotídica y su nivel de significación, calculado según el test de Tukey, con los iniciadores utilizados.

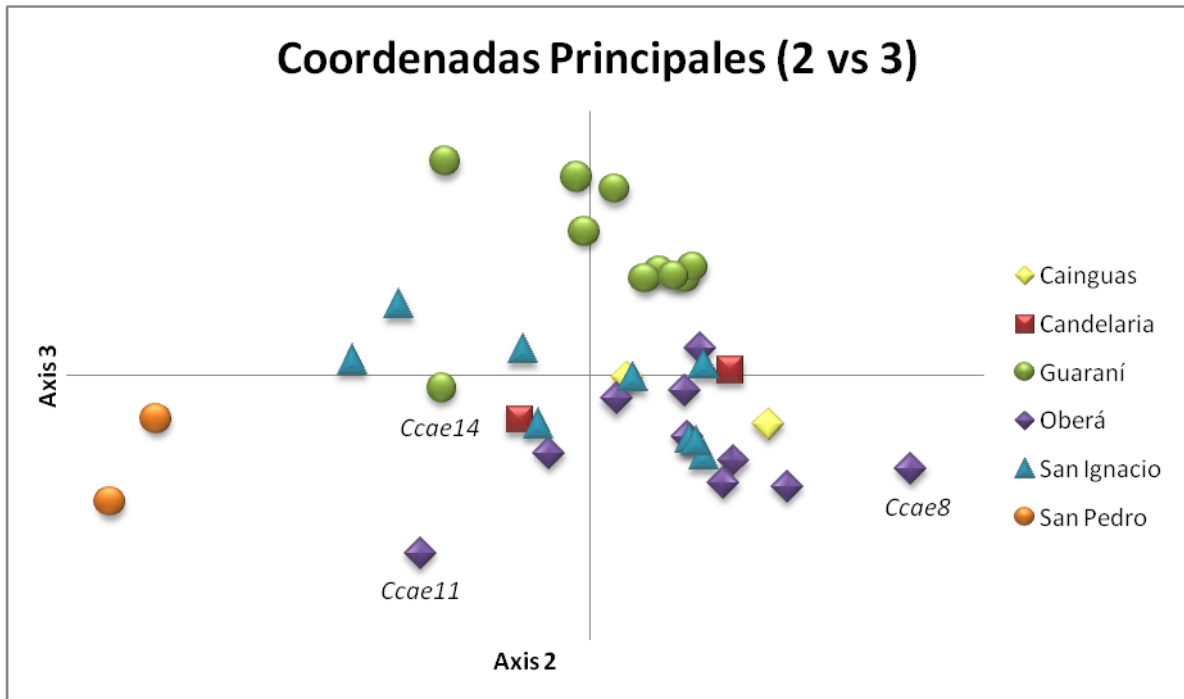
Repeticiones	Promedio bandas polimórficas	Número de iniciadores	Significación
<b>CT-TC</b>	42,50	2	A
<b>GT-TG</b>	50,00	2	A
<b>CA-AC</b>	52,00	2	A
<b>GA-AG</b>	57,00	3	A
<b>Tri-Tetra</b>	56,75	4	A

*Letras distintas indican diferencias significativas ( $p \leq 0,01$ )*

**Tabla 12:** Promedio de bandas polimórficas según motivos de repetición y su valor de significación.

La Figura 16 muestra el gráfico de coordenadas principales (GenAlEx 6.4), para la confección del mismo se tuvo en cuenta el origen geográfico de cada uno de los individuos analizados, de manera de poder identificar a los individuos por departamento. En el mismo puede verse que el 90% de los individuos de Guaraní se encuentran sobre el eje 3 positivo, mientras que el individuo *Ccae14*, está por debajo del mismo, alejado del resto. Cabe destacar que este mismo individuo en el dendrograma se encuentra unido en forma independiente. Los individuos de San Ignacio presentan una mayor dispersión en comparación con los individuos de Guaraní y Oberá, exceptuando a los individuos *Ccae8* y *Ccae11* de Oberá, que se hallan más alejados del resto, al igual que en el dendrograma (Figura 14) donde se unen en forma aislada al *cluster* A<sub>1</sub>-A<sub>6</sub> y al grupo A-B, respectivamente. Los

individuos de Cainguas y Candelaria comparten la misma ubicación espacial que los individuos de San Ignacio y Oberá, mientras que aquellos de San Pedro, se ven claramente alejados del resto, al igual que en el dendrograma.



**Figura 16:** Gráfico de coordenadas principales 2 vs 3. En el mismo se encuentran identificados algunos individuos.

#### 5.4.4. ESTRUCTURA Y VARIACIÓN POBLACIONAL

Se llevó a cabo un análisis de los individuos estudiados de *C. caesia* según las zonas de recolección de cada uno, se tomaron para esta parte del estudio aquellas poblaciones que contaban con 9 y 10 individuos por región, i.e. San Ignacio (9), Oberá (10) y Guaraní (10).

Los datos de los estadísticos obtenidos mediante los programas Arlequin 3.5.1.2 y GenAlEx 6.4 por departamento se resumen en las Tablas 13, 14 y 15.

Los 29 individuos de los 3 departamentos generaron un total de 652 *loci*, con un porcentaje de polimorfismo del 97,40%. El porcentaje promedio de *loci* polimórficos por departamento resultó ser del 65,59%. Siendo los porcentajes máximos para las poblaciones de Guaraní (68,25%) y Oberá (66,41%), y el menor para San Ignacio (62,12%) (Tabla 13).

Población	San Ignacio	Oberá	Guaraní	Promedio	SE
<b>Número de <i>loci</i> polimórficos</b>	405	433	445	427,667	20,526
<b>% <i>loci</i> polimórficos</b>	62,12%	66,41%	68,25%	65,59%	1,82%

**Tabla 13:** Número y porcentaje de *loci* polimórficos en cada uno de los departamentos. SE: error estándar. (GenAlEx 6.4 y Arlequín 3.5.1.2).

Los índices de diversidad genética (PIC) variaron de 0,144 para la población de San Ignacio a 0,170 para la población de Oberá, con una media de 0,158. La tendencia para los datos de UHe es la misma que para el PIC (Tablas 14-15).

Los índices de Shannon mostraron un promedio de 0,256, con un valor máximo para la población de Oberá (0,271) y un mínimo para San Ignacio (0,235) (Tablas 14-15).

Población		N	PIC	UHe	H'
<b>San Ignacio</b>	Promedio	9,000	0,144	0,152	0,235
	SE	0,000	0,006	0,006	0,009
<b>Oberá</b>	Promedio	10,000	0,170	0,179	0,271
	SE	0,000	0,007	0,007	0,009
<b>Guaraní</b>	Promedio	10,000	0,162	0,171	0,263
	SE	0,000	0,006	0,007	0,009

**Tabla 14:** Promedio y SE en cada *loci* por cada departamento. N: Número de individuos, PIC: diversidad genética, UHe: Heterocigosidad esperada imparcial, H': Índice de Shannon. SE: error estándar.

		N	PIC	UHe	H'
<b>Total</b>	Promedio	9,667	0,158	0,167	0,256
	SE	0,011	0,004	0,004	0,005

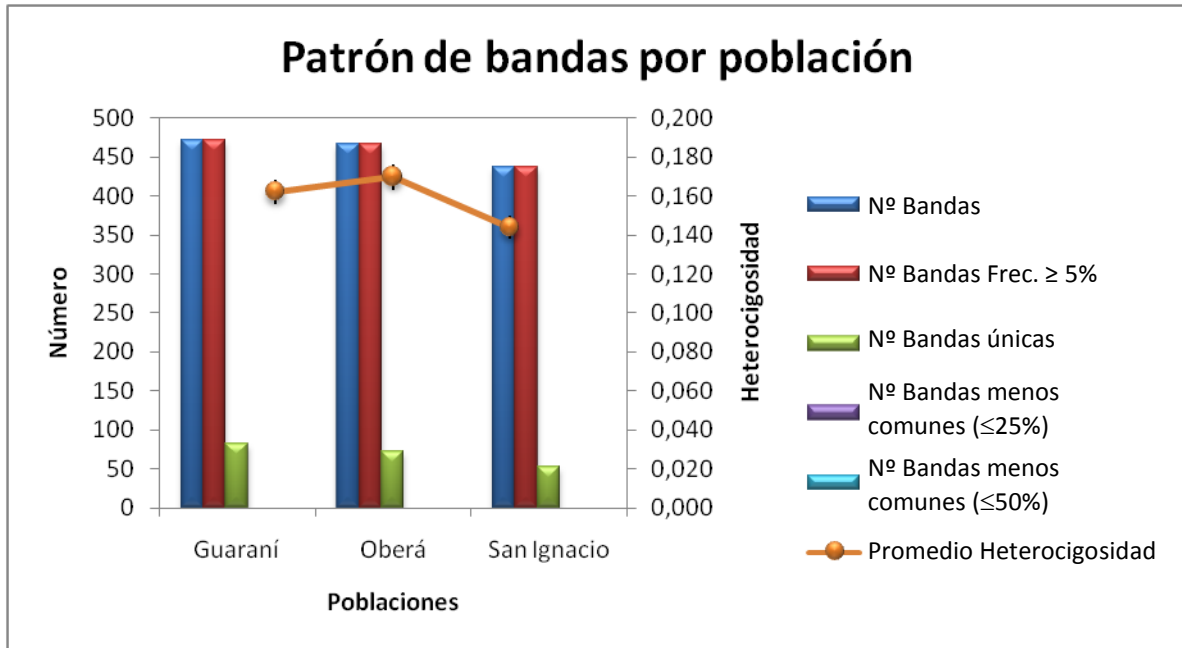
**Tabla 15:** Promedio general y SE sobre *loci* en las 3 regiones. N: Número de individuos, PIC: diversidad genética, UHe: Heterocigosidad esperada imparcial, H': Índice de Shannon. SE: error estándar.

Los datos obtenidos del patrón de bandas de los individuos estudiados según la zona geográfica se indican en la Tabla 16, la Figura 17 representa el gráfico derivado de la misma.

Población	Total	Guaraní	Oberá	San Ignacio
<b>Nº Bandas</b>	652	472	467	437
<b>Nº Bandas Frec. <math>\geq 5\%</math></b>	507	472	467	437
<b>Nº Bandas únicas</b>	-	83	73	53
<b>Nº Bandas menos comunes (<math>\leq 25\%</math>)</b>	0	0	0	0
<b>Nº Bandas menos comunes (<math>\leq 50\%</math>)</b>	0	183	185	167
Promedio PIC	0,175	0,162	0,170	0,144
SE del promedio PIC	0,006	0,006	0,007	0,006
Promedio UHe	0,178	0,171	0,179	0,152
SE del promedio UHe	0,006	0,007	0,007	0,006

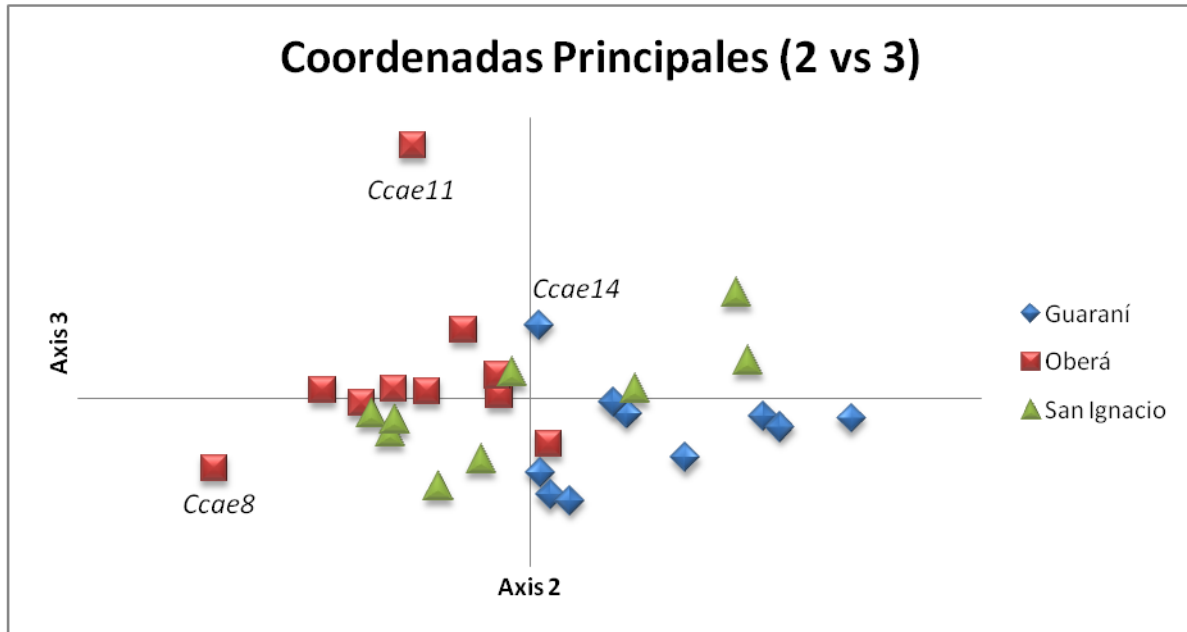
**Tabla 16:** Patrón de bandas obtenidos de los datos binarios (GenAlEx 6.4). Nº Bandas Frec.  $\geq 5\%$ : Número de bandas con frecuencia  $\geq 5\%$ . Nº Bandas menos comunes ( $\leq 25\%$ ): Número de bandas menos comunes (Frecuencia  $\leq 25\%$ ) encontrada en 25% o menos de las poblaciones; Nº Bandas menos comunes ( $\leq 50\%$ ): Número de bandas menos comunes (Frecuencia  $\leq 50\%$ ) encontrada en 50% o menos de las poblaciones; PIC: Diversidad genética/contenido de información polimórfica; UHe: Heterocigosidad esperada imparcial. SE: error estándar. Se asume el equilibrio de Hardy-Weinberg para datos binarios diploides.

El número de bandas únicas refiere a los *loci* que se encuentran sólo en una de las poblaciones de las tres en estudio.



**Figura 17:** Patrones de bandas totales de los datos binarios obtenidos de la población de *C. caesia* derivado de la tabla 21 (GenAlEx 6.4). No. Bands = Número de alelos; No. Bands Frec.  $\geq 5\%$ : Número de alelos con frecuencia  $\geq 5\%$ ; No. Private Bands: Número de bandas únicas; No. LComm Bands ( $\leq 25\%$ ): Número de bandas menos comunes (Frecuencia  $\leq 25\%$ ) encontrada en 25% o menos de las poblaciones; No. LComm Bands ( $\leq 50\%$ ): Número de bandas menos comunes (Frecuencia  $\leq 50\%$ ) encontrada en 50% o menos de las poblaciones; He: Heterocigosidad esperada o contenido de información polimórfica.

La Figura 18 muestra el gráfico de Coordenadas Principales obtenidos con el programa GenAlEx 6.4 para los individuos de Guarani, Oberá y San Ignacio. En el mismo puede observarse la misma tendencia que mostraban las coordenadas principales con la colección total, es decir, los individuos de San Ignacio más dispersos que los de Oberá y Guarani, asimismo se pueden distinguir a los individuos *Ccae8*, *Ccae11* y *Ccae14* alejados de sus respectivos grupos, como ocurre tanto en el dendrograma (Figura 14) como en el gráfico de PCoA (Figura 18).

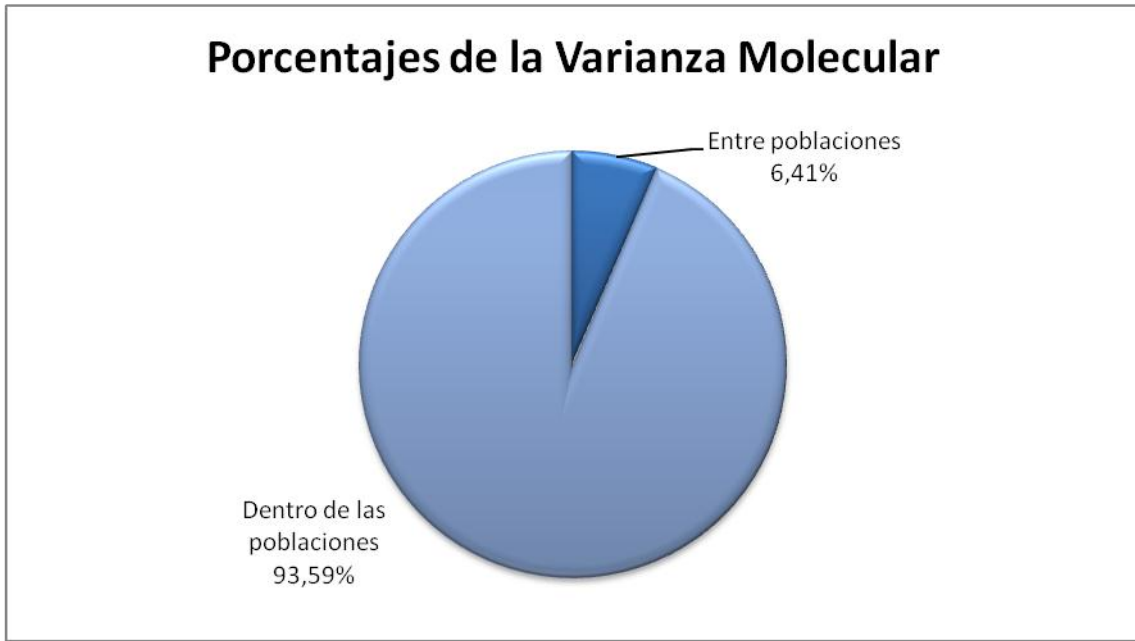


**Figura 18:** Gráfico de coordenadas principales 1 vs 3, según la matriz de distancia sin estandarización de datos, obtenida mediante el programa GenAlEx 6.4 de los 29 individuos de las poblaciones de Guaraní, Oberá y San Ignacio.

El análisis molecular de la varianza (AMOVA) de los *loci* presentes en los 29 individuos de San Ignacio, Oberá y Guaraní (Tabla 17, Figura 19) mostró un porcentaje de variación de 6,41% entre las poblaciones y un 93,59% dentro de las poblaciones. El índice de fijación  $F_{st}$  fue estimado en 0,06409 y según de Vicente *et al.* (2004) y Franco *et al.* (2001), indicaría que las poblaciones analizadas tienen una diferenciación media-baja. Asimismo, se puede interpretar indirectamente que a menores valores de  $F_{st}$ , el flujo génico es mayor, y aún no hay fijación de alelos en las poblaciones analizadas, sin embargo para sacar una conclusión, sería necesario analizar un mayor número de *loci* (incrementando el número de individuos).

Fuente de variación	Grados de Libertad	Suma de cuadrados	Componentes de la Varianza	Porcentaje de variación
Entre poblaciones	2	250,853	5,17066	6,41%
Dentro de las poblaciones	26	1963,078	75,50299	93,59%
<b>Total</b>	<b>28</b>	<b>2213,931</b>	<b>80,67365</b>	<b>100%</b>
<b>Índice de Fijación</b>	<b>Fst:</b>	<b>0,06409</b>	<b>P(rand ≥data)=0,001</b>	

**Tabla 17:** Resumen de los datos obtenidos del análisis de la varianza molecular (AMOVA) (1023 permutaciones).



**Figura 19:** Gráfico de los porcentajes de la Varianza Molecular derivado de la Tabla 17.



---

## 6. DISCUSIÓN

La caracterización e identificación genética del germoplasma, mediante marcadores moleculares, constituyen un área de aplicación de creciente importancia dentro de la producción vegetal, considerándose relevante el conocimiento de la variabilidad de la flora nativa con potencial ornamental que puede llegar a competir dentro del mercado florícola, tanto nacional como internacional. En este sentido, los marcadores moleculares son herramientas claves tanto para la clasificación del germoplasma como para su aplicación en programas de mejoramiento y selección asistida por marcadores (Cubero, 2003).

Uno de los muchos beneficios del incremento de información de secuencias de ADN de distintos organismos, es la oportunidad de desarrollar nuevos marcadores moleculares. Como en la mayoría de las especies de interés ornamental, aún no está disponible el genoma completo, para *Calibrachoa* es importante la búsqueda de nuevas estrategias para su desarrollo y el uso de los marcadores moleculares cuando los recursos son limitados. Dentro de las distintas tecnologías que existen para el desarrollo de marcadores moleculares, sin el conocimiento de la secuencia de ADN, se encuentran los ISSR como una alternativa posible, ya que pueden proveer gran número de marcadores con baja inversión, son sensibles a bajos niveles de variación genética (Wang *et al*, 2009), existe la posibilidad de obtener alto rendimiento en análisis de un gran número de muestras con un secuenciador automático, y la facilidad de que pueden realizarse las corridas electroforéticas tanto en geles de poliacrilamida como de agarosa, además de ser útiles en varias ramas dentro del estudio molecular (Edwards y McCouch, 2007).

Asimismo, el estudio de la diversidad tanto fenotípica como genética para la identificación de grupos con similares características genotípicas es importante para la conservación, evaluación y utilización de los recursos genéticos, para estudiar de la diversidad del germoplasma pre-mejorado y mejorado, como para determinar la distinguibilidad de un genotipo específico con el propósito de protección de los derechos de propiedad intelectual del mejorador (Langridge y Chalmers, 2004; Jorasch, 2004).

La finalidad del análisis preliminar consistió en determinar las condiciones óptimas de hibridación de los 13 iniciadores estudiados a fin de contar con información para futuros análisis en las especies nativas del género *Calibrachoa* con el propósito de incluirlas en futuros programas de mejoramiento del género. En esta parte del análisis se obtuvieron 1245 *loci* polimórficos, siendo posible además,

obtener un dendrograma que agrupó a los individuos por especie (Figura 9). Estos resultados, a pesar de ser preliminares, resultan promisorios, mostrando que los ISSR son una herramienta útil para el análisis por especie. Se debe recalcar que el dendrograma muestra niveles de similitud entre las especies estudiadas, y no refleja verdaderas relaciones filogenéticas, ya que sólo se analizaron dos individuos por especie, siendo necesario un mayor número de individuos como de iniciadores, además de análisis de secuencia de cloroplasto o mitocondria a fin de determinar las verdaderas relaciones filogenéticas.

Para la colección de *C. caesia*, con los 13 iniciadores utilizados se han obtenido 701 *loci*, 687 de éstos polimórficos, con un promedio de 54 *loci* por iniciador y 542 fragmentos con frecuencia mayor o igual al 5% (Tabla 11). El promedio de diversidad genética o PIC resultó ser 0,164, mientras que el promedio del índice de Shannon fue 0,278 (Tabla 10). Cabe destacar que los 35 haplotipos analizados son diferentes entre sí, permitiendo una identificación inequívoca de cada uno de los individuos de la colección.

Según González *et al.* (2005) y Pérez de la Torre *et al.* (2010) el nivel de polimorfismo detectado por los ISSR depende tanto de la especie vegetal a ser analizada, como del tipo de secuencia repetitiva incorporada al iniciador utilizado para generar los productos de amplificación.

En este trabajo se utilizaron los mismos iniciadores que los descritos en Escandón *et al.* (2007), en el cual se lograron identificar molecularmente nuevas variedades de *Nierembergia lineariaefolia*. En ese trabajo se realizó el análisis de 6 variedades de *N. lineariaefolia* mediante AFLP e ISSR, logrando obtener resultados similares por ambas técnicas, demostrando que la sensibilidad de 13 iniciadores ISSR era comparable a la de seis combinaciones de enzima/iniciador de AFLP, sumado a la baja laboriosidad de la técnica y el bajo costo de los ISSRs.

En Escandón *et al.* (2007) las 6 variedades de *N. lineariaefolia* analizadas dieron un total de 443 *loci* polimórficos, con un 96,39% de polimorfismo y un promedio de 32,80 *loci* por iniciador. Para el caso de los 35 individuos de *C. caesia* analizados en este estudio, se identificó un total de 701 *loci* con un polimorfismo del 98% y el promedio de *loci* polimórficos por iniciador resultó ser de 52,85. En relación a los porcentajes de polimorfismo encontrados, para el caso de las variedades de *N. lineariaefolia*, los iniciadores con 100% de polimorfismo fueron: 5'CT, 5'GT, 5'GA, 5'GACA y 3'TC, mientras para *C.caesia*, los iniciadores fueron 5'CA, 3'CAC y 3'TG, coincidiendo en los iniciadores 5'CT, 5'GA, 5'GACA y 3'TC. Los iniciadores más informativos, teniendo en cuenta el porcentaje de polimorfismo y el Rp fueron 5'GT (%P=100 y Rp=12,67) y 5'CA (%P=98,25 y Rp= 13,67), seguidos por

los iniciadores 3'AC y 5'GACA (Rp alrededor de 7), mientras que en este trabajo se vió que los iniciadores más informativos, siguiendo el mismo criterio y con un porcentaje de polimorfismo del 100%, fueron 5'GACA, 5'GA, 5'CA y 5'CT (Tabla 10). Cabe tener en cuenta que el Rp es una medida que toma en consideración la proporción de individuos que contienen la banda, por lo tanto, cuanto mayor sea el número de muestras, el valor de Rp se verá incrementado. Se debe considerar, además, que los estadísticos aquí calculados (i.e. Rp, PIC, MI, H'), corresponden a este grupo de datos, y que si bien podrían ser extrapolados a otras especies del género, no se puede inferir más allá del mismo, ni siquiera a otro género tan relacionado con *Calibrachoa*, como *Petunia*.

En otros géneros ornamentales, como *Mecardonia*, los iniciadores 5'CT, 5'CA, 5'GA, 3'GA, 3'AC, 3'AG y 3'TG, lograron caracterizar molecularmente a 25 individuos de 2 especies del género, *M. procumbens* var. *flagellaris* y *M. procumbens* var. *tenella* (Pérez de la Torre, *et al.*, 2010), mientras que en *Jacaranda mimosifolia*, los iniciadores 5'GA, 5'CA, 5'CT y 3'GA permitieron diferenciar a los 21 individuos involucrados en ese trabajo (Escandón *et al.*, 2005b). El porcentaje de polimorfismo encontrado en el primero de estos trabajos, fue del 100% para todos los iniciadores, en tanto que en *J. mimosifolia* los porcentajes variaron del 100% para 5'CT a 71,4% para 5'CA. Los valores de Rp reportados en *Mecardonia* no difieren demasiado con los encontrados en *Calibrachoa*, oscilando de 11,92 para 3'TG a 25,23 para los iniciadores 5'CT y 5'GA, para *Mecardonia* y de 10,29 a 23,20 para 3'AG y 5'GACA, respectivamente para *Calibrachoa* (Tabla 10). Lo mismo ocurre para el PIC y el MI, donde en *Mecardonia* se obtuvo un promedio de 0,130 para el PIC y valores que van desde 12,160 a 5,875 para el MI, frente al valor promedio de PIC de 0,164 y valores de MI de 11,70 a 5,87, encontrados en este estudio (Tabla 10).

En *Primula obconica* (Peng Nan *et al.*, 2003), se utilizaron 14 ISSRs para analizar 60 individuos de una población natural de China, aquí el iniciador 3'AC obtuvo un total de 21 bandas, 17 de ellas polimórficas, para el caso de los 35 individuos de *C. caesia*, este mismo iniciador generó 45 bandas, siendo polimórficas 41 de ellas.

Los ISSR además son utilizados en otros géneros no ornamentales; Christopoulos *et al.* (2010) estudiaron la diversidad genética entre poblaciones nativas y cultivares internacionales de nuez (*Junglans regia*) en Grecia, mediante 7 ISSR; de este trabajo coincidieron dos de los iniciadores utilizados en *Calibrachoa* (3'AC y 3'TG). Para *Junglans regia* el iniciador 3'AC presentó un total de 12 bandas, 9 de ellas polimórficas con un %P de 75, PIC=0,35, MI=3,15 y Rp=4,75, en tanto que *Calibrachoa* mostró los siguientes valores: 45 bandas totales, 41 polimórficas, %P=91,11, PIC=0,166, MI=6,79 y Rp=14,17; mientras que los valores para el iniciador 3'TG en nuez y *C. caesia* fueron: 14 y

56 bandas totales, 10 y 56 polimórficas, 71,4% y 100% de polimorfismo, PIC=0,304 y 0,105, MI= 3,04 y 5,87 y Rp= 4,29 y 10,51, respectivamente.

En el presente trabajo, al igual que en Manimekalai y Nagarajan (2006), se utilizaron los iniciadores 3'AG y 3'AC, estos autores, evaluaron mediante 19 ISSR, las relaciones genéticas en 33 entradas de coco (*Cocos nucifera* L.) de una colección del Banco Internacional de Germoplasma de la India. El iniciador 3'AG resultó menos polimórfico (80%) en *C. nucifera* versus el 95,74% obtenido en *C. caesia*. También se observaron diferencias con relación al MI, el mismo fue de 3,147 para coco (uno de los 5 valores más altos) y de 7,41 en este caso (Tabla 8). Para el iniciador 3'AC, los porcentajes de polimorfismo fueron opuestos, del 100% para coco y del 91,11% -el menor- para *C. caesia* (Tabla 8), y al igual que en *Calibrachoa*, el MI resultó ser de los valores más bajos.

Fernández *et al.* (2002) utilizando 10 RAPD y 10 ISSR en cebada, pudieron detectar la diversidad genética de los 16 cultivares estudiados. En ese trabajo, 3 de los 10 iniciadores ISSR fueron los mismos que los analizados en *Calibrachoa* (3'AC, 3'TG y 3'GGG). Cabe destacar que los valores de bandas totales, polimórficas y porcentajes de polimorfismo hallados para estos 3 iniciadores, son menores que los encontrados en *Calibrachoa*, sin embargo coincide el hecho que el iniciador 3'GGG presentó los mayores valores de los 3, al igual que en este estudio.

En arroz, Reddy *et al.* (2009) determinaron las relaciones de 12 variedades mediante 17 ISSR. Los valores obtenidos con el iniciador 3'AG fueron de 9 *loci* totales y 8 *loci* polimórficos, con un valor de 0,53 de PIC y Rp=4,0, y con el iniciador 3'TC las bandas totales fueron 12, 10 de ellas polimórficas, con un PIC=0,63 y Rp= 3,7; los valores para este último iniciador en *C. caesia* fueron 45 *loci* totales, con un 100% de polimorfismo, el PIC fue de 0,132 y el Rp=12,29 (Tabla 10). Blair *et al.* en 1999, utilizó 32 iniciadores para analizar 59 genotipos seleccionados de arroz, en este caso los iniciadores comunes con este trabajo fueron 3'GA, 5'CA, 5'CT, 5'GT y 5'GA. En *Oryza sativa* L., los valores de bandas totales fueron de 55, 55, 67, 47 y 66 respectivamente, con un porcentaje de polimorfismo de 94,5% para 3'GA, 81,8% para 5'CA, 88,1% para 5'CT, 76,6% para 5'GT y 90,9% para 5'GA; mientras que para *C. caesia* los porcentajes de polimorfismo fueron del 100%, excepto para 5'GT y 3'GA que fueron de 95,65% y 98,21, respectivamente (Tabla 10).

Ruan *et al.* (2009) caracterizaron e identificaron 52 individuos de 16 variedades y líneas de Espino cerval de mar (*Hippophae* L.) mediante 15 ISSR. Los autores utilizaron los iniciadores 3'AG, 3'AC y 3'GGG, al igual que en *Calibrachoa*. En *Hippophae* L. los porcentajes de polimorfismo de estos 3 iniciadores fueron del 100%, con un total de bandas de 22, 21 y 35, respectivamente. Aquí, el

iniciador 3'GGG presentó la mayor cantidad de bandas, obteniéndose en promedio, 23 bandas por individuo.

Mansyah *et al.* (2010) evaluaron con 11 iniciadores ISSR, 23 individuos de Mangostán (*Garcinia mangostana* L.), en ese caso el iniciador 5'GA reveló un total de 6 bandas, todas ellas monomórficas. En contraposición con este análisis, donde este mismo iniciador reveló un total de 71 *loci* con un 100% de polimorfismo.

El alto nivel de polimorfismo observado (98%) con los ISSR empleados en el presente trabajo, indican un alto nivel de variación genética existente en los individuos de *C. caesia* analizados, cumpliéndose lo concluido por Rakoczy-Trojanowska y Bolibok (2004), quienes reportaron patrones altamente polimórficos por reacción cuando se utilizan iniciadores basados en secuencias microsatélites.

Estos resultados corroboran lo afirmado por González *et al.* (2005) y Pérez de la Torre *et al.* (2010) en relación al nivel de polimorfismo detectado por iniciador.

La aparición de *loci* monomórficos para los iniciadores 5'GT, 3'CAG, 3'GGG, 3'GA, 3'AG y 3'AC (Tabla 10) abre un campo de exploración en el área de marcadores de especie, un análisis con un mayor número de individuos podría reafirmar estos resultados, brindando un marcador tipo STS para ser aplicado en futuros trabajos de identificación.

Uno de los aspectos que genera controversias entre diferentes autores es la capacidad de cobertura del genoma por parte de los diferentes iniciadores disponibles en el mercado según estén anclados o no y si ese anclaje es en 3' o 5' [ver Bathia *et al.*, (2009); Pradeep Reddy *et al.*, (2002); Joshi *et al.*, (2000) y Blair *et al.*, (1999)]. En el presente trabajo no se detectaron diferencias significativas en relación a los iniciadores anclados en 3' o en 5', ya sean di, tri o tetranucleótidos (para los iniciadores 3' se obtuvieron 52 *loci* en promedio, mientras que para los 5' fueron 57). Analizando los iniciadores con repeticiones de dinucleótidos vs tri y tetranucleótidos, tampoco se encuentran diferencias relevantes (52,1 *loci* promedio para dinucleótidos vs 58 para tri y tetranucleótidos), a pesar de no ser significativa esta diferencia, este mayor número de *loci* amplificados para los tri y tetranucleótidos coincide con el trabajo de Weising *et al.* (1995, en Weising *et al.*, 2005), en el cual sólo se obtuvieron patrones de bandas polimórficas con este mismo número de repeticiones. Gupta *et al.* (1994) utilizaron 23 iniciadores di, tri, tetra y pentanucleótidos para la amplificación de ADN genómico en eucariotas, ellos encontraron que las repeticiones de tetranucleótidos fueron más eficientes para amplificar patrones polimórficos, aunque iniciadores ricos en motivos GC y AT, fueron también adecuados.

Según Blair *et al.* (1999) los iniciadores con motivos poli(GA) generan en promedio mayor número de bandas que los poli(GT), en *C. caesia* se corroboró lo mismo, los iniciadores con motivo poli(GA) obtuvieron 63,5 *loci* en promedio vs las 46 bandas obtenidas con el iniciador poli(GT), y en contraposición a éste, donde los iniciadores dinucleótidos anclados en 5' produjeron mayor número de fragmentos monomórficos, en *C. caesia* los iniciadores 3' fueron los que presentaron más cantidad de *loci* monomórficos (6 de 8 iniciadores 3' y 1 de 5 iniciadores 5', Tabla 10). Este resultado podría llegar a explicarse debido a que los iniciadores anclados en 5' incluyen en su producto de amplificación la secuencia completa del microsatélite, y dado que su longitud varía a lo largo de todo el genoma, es esperable encontrar un mayor número de bandas y mayor grado de polimorfismo (Pradeep Reddy, *et al.*, 2002). En general, los iniciadores con repeticiones (AG), (GA), (CT), (TC), (AC) y (CA), muestran mayor polimorfismo que otros iniciadores di, tri o tetranucleótidos con diferentes motivos (Pradeep Reddy, *et al.*, 2002), sin embargo, en este trabajo no se han encontrado diferencias significativas (Tabla 12).

Estos resultados estarían reafirmando la fuerte influencia de la interacción genoma/iniciador para la generación de perfiles y el análisis de la variabilidad.

En el análisis del dendrograma de la colección de *C. caesia*, se pueden diferenciar 2 grupos, A y B, los cuales están formados de varios sub-grupos menores; en el caso del grupo A, el más heterogéneo, podemos observar que se encuentran individuos de todas las regiones involucradas en el análisis, con excepción de los individuos de San Pedro, que conforman un núcleo separado del resto.

Los sub-grupos A<sub>3</sub> y A<sub>7</sub> están constituidos por individuos de la región de San Ignacio, los niveles de agrupamiento son de 0,8521 y 0,8115, respectivamente, mientras que los individuos *Ccae9* y *Ccae22*, también de San Ignacio, se agrupan en 0,8501, pero forman parte del sub-grupo A<sub>6</sub> junto con 3 individuos de Misiones (*Ccae15, 16 y 17*) (Figura 14).

Los dos individuos de Cainguas forman un núcleo en 0,8742, al que se les une en 0,8549, *Ccae3* de Candelaria (A<sub>5</sub>), el otro individuo de Candelaria (*Ccae21*) forma parte del sub-grupo A<sub>4</sub>, formado por 3 individuos de la zona de Oberá; ambos sub-grupos, incluido el sub-grupo A<sub>3</sub>, integran el grupo A<sub>1</sub> (Figura 14).

El grupo B está constituido por individuos de la región de Guaraní (B<sub>1</sub>) e individuos de Oberá (B<sub>2</sub>). Este agrupamiento podría explicarse debido a que ambas regiones se encuentran muy próximas geográficamente (Figura 3).

Los individuos *Ccae2* y *Ccae12* al igual que *Ccae 10* y *Ccae11* formaban parte de 2 poblaciones de la región de Oberá, sin embargo, cada uno de ellos fue recolectado por sus diferencias fenotípicas *in situ*, ya sea por diferencias en el hábito (erecto o rastrero), tamaño de corola o apertura de la flor en condiciones de sombra (Hagiwara, com. pers.), estas diferencias pueden deberse tanto a condiciones ambientales como genotípicas, y como puede verse en el dendrograma, las diferencias observadas a campo se ven reflejadas también en los niveles de similitud obtenidos. Un análisis más profundo con un mayor número de individuos con similares caracteres fenotípicos y un mayor número de iniciadores podría llegar a revelar algún marcador que pudiera ser de utilidad para hacer una diferenciación temprana en el marco de un programa de mejoramiento asistido por marcadores moleculares.

Los individuos *Ccae11* de Oberá y *Ccae14* de Guaraní no forman parte de ninguno de los grupos generados en el dendrograma, se unen a nivel de 0,7665 y 0,7839, respectivamente, por fuera del nodo que integran los grupos A y B. Los patrones de amplificación obtenidos de estos dos individuos con los 13 iniciadores, muestran claras diferencias al resto de la población de la misma región, por lo que deberían incrementarse el número de individuos como de iniciadores para corroborar la unión. Sin embargo ambos individuos se agruparon juntos, como especie, en el dendrograma derivado del análisis de las especies nativas del género (Figura 9).

El gráfico de Coordenadas Principales según los ejes 2 vs 3 (Figura 16) refleja la dispersión de los individuos de las diferentes poblaciones. En el mismo puede verse a los individuos de San Pedro juntos y alejados del resto de las poblaciones, mientras que los individuos de la población de Guaraní no tienen una gran dispersión, a excepción de *Ccae14*, que se encuentra alejado del resto, de la misma forma ocurre en el dendrograma (Figura 14), sin embargo fenotípicamente no se puede hallar una explicación posible, ya que este individuo no muestra características diferenciales con el resto de los individuos analizados de la misma región. La distribución de los individuos de la población de Oberá se manifiesta también en el dendrograma, el gráfico muestra a los individuos *Ccae11* y *Ccae8* alejados del centro de distribución de la población, una posible explicación al alejamiento de *Ccae8* es su diferencia fenotípica, la misma es un color de corola más claro que el resto, sin embargo, la distribución de *Ccae11* no puede ser explicada por algún rasgo morfológico observado *in situ*, ya que este individuo comparte caracteres fenotípicos similares al resto de la población.

Se llevó a cabo, además, un análisis de 3 poblaciones de *C. caesia*, teniendo en cuenta sólo aquellas con mayor cantidad de individuos, i.e. Guaraní, Oberá y San Ignacio. Los datos generados muestran que las 3 poblaciones amplificaron un total de 652 *loci* (93% del total obtenido con todos los

individuos), con 507 *loci* con una frecuencia mayor o igual al 5% (Tabla 16), siendo el promedio de diversidad genética de 0,158. Las poblaciones incluidas en esta parte del análisis muestran la misma tendencia, en relación a los índices de diversidad, que la colección total.

La población de Oberá es la de mayor promedio de diversidad genética (0,170, Tabla 14), mientras que la población de Guaraní es la que revela el mayor porcentaje de *loci* polimórficos (68,25%, Tabla 13), como también el mayor número de bandas únicas de una población (Tabla 16), mientras que los individuos de San Ignacio son los que generaron el menor número de éstas (Tabla 16).

El gráfico de coordenadas principales (Figura 18) para estas 3 poblaciones revela la misma distribución que en el gráfico de PCoA para la totalidad de la colección de *C. caesia*, con los individuos *Ccae8*, *Ccae11* y *Ccae14*, alejados del centro de distribución de sus respectivas poblaciones.

El análisis de la varianza molecular realizado para examinar las diferencias entre y dentro de las poblaciones muestra, con alto valor significativo ( $p < 0,001$ ), que la mayor parte de la variación genética (93,59%) ocurre dentro de las poblaciones, mientras que la varianza entre poblaciones fue sólo del 6,41%. Estos resultados indican la diferenciación genética dentro de las 3 poblaciones estudiadas, revelando la homogeneidad de las 3 poblaciones en estudio. De acuerdo a Salhi-Hannachi *et al.* (2005), la baja divergencia entre las poblaciones y la gran variabilidad detectada entre los individuos podrían estar explicadas por la ocurrencia de flujo génico en las poblaciones naturales de las cuales se originaron estas poblaciones o bien pudieran tener un origen común. Se debe tener en cuenta que las 3 poblaciones analizadas se encuentran en un radio de 25 Km en la provincia de Misiones.

Los resultados obtenidos en este trabajo reafirman a los ISSR como marcadores útiles para el estudio de la diversidad genética, debido al gran polimorfismo detectado por iniciador; además su simple manipulación y bajo costo, los convierte en una buena alternativa de elección cuando no se tiene conocimiento de la base genética de la especie o género a analizar, y se requieran de resultados rápidos y confiables.



---

## 7. CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS

Se optimizó el protocolo de extracción y purificación de ADN para el género *Calibrachoa*.

Se optimizó el protocolo de amplificación de ISSRs para el género *Calibrachoa* para su utilización en el análisis de diversidad entre 13 especies nativas del género y entre individuos de la especie *C. caesia*.

Se analizó la variabilidad genética y el grado de polimorfismo de los 35 individuos de la colección de *C. caesia* del IF.

Se halló a través del AMOVA, una gran variación molecular a nivel intrapoblacional (elegidos *a priori* según su origen geográfico).

Se logró establecer un perfil de identificación molecular (PIM) mediante ISSRs de todos los individuos incluidos en este trabajo, logrando caracterizar molecularmente a cada uno de ellos en forma unívoca. Esta metodología podría ser implementada a nuevas variedades obtenidas en el Instituto de Floricultura, generando información adicional al descriptor de éstas en el Registro Nacional de Cultivares, como también ser una herramienta que aportaría pruebas en casos de violaciones al registro de obtentor.

Los resultados obtenidos contribuirán con información valiosa para ser utilizada en los planes de mejoramiento del género *Calibrachoa* llevado a cabo en el Instituto de Floricultura, como en futuros análisis poblacionales.

## ANEXOS

### ANEXO I: UBICACIÓN GEOGRÁFICA DE LAS ESPECIES NATIVAS DEL GÉNERO CALIBRACHOA

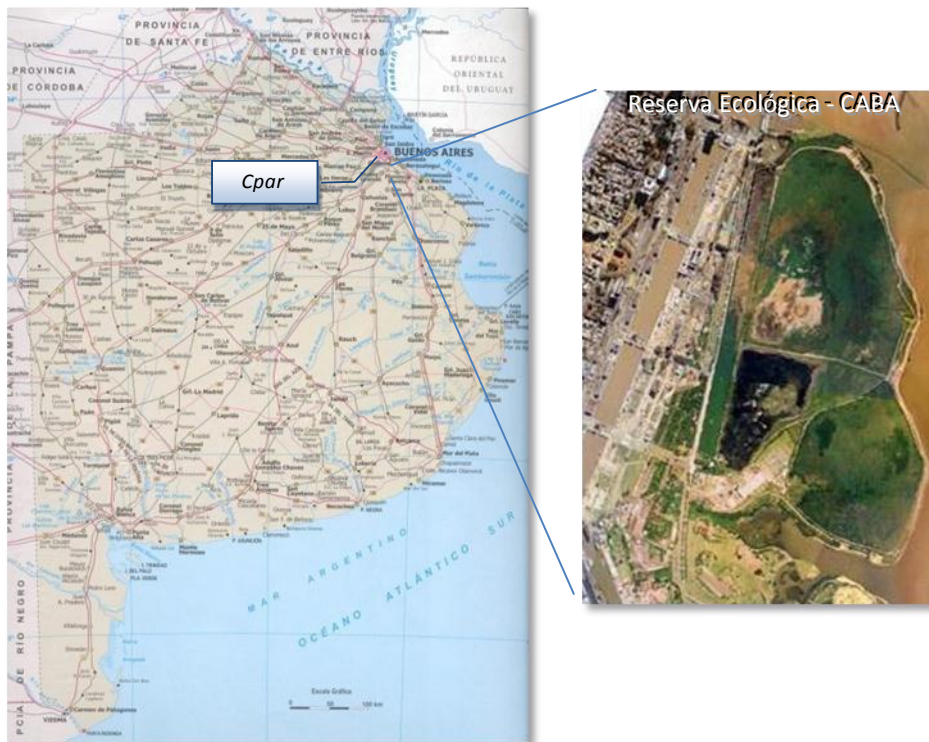


Figura 20: Ubicación de los individuos de *Calibrachoa* en la provincia de Buenos Aires.

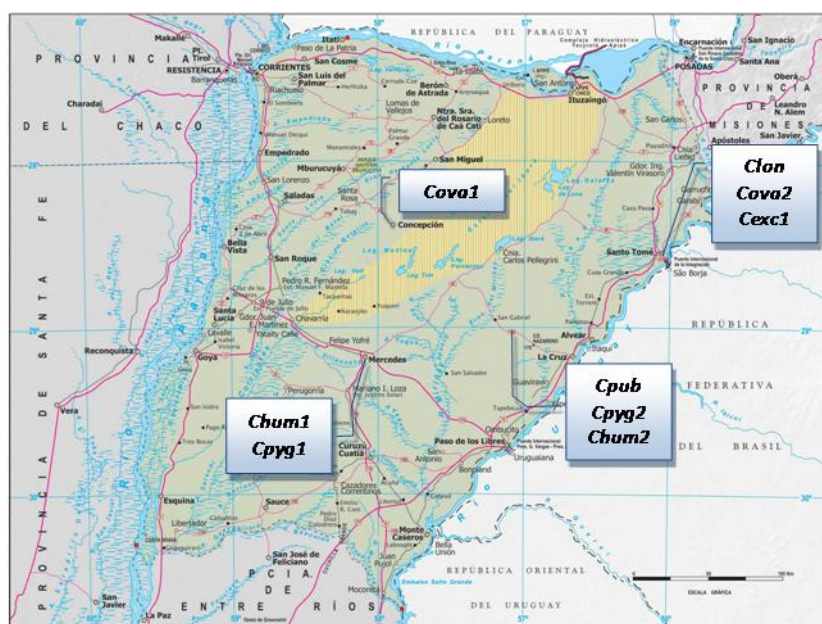


Figura 21: Ubicación de los individuos de *Calibrachoa* en la provincia de Corrientes.

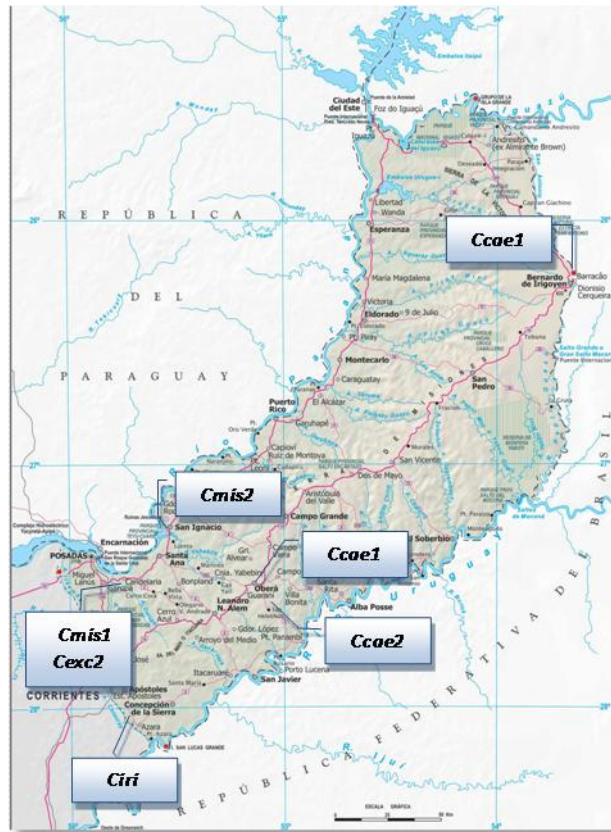


Figura 22: Ubicación de los individuos de *Calibrachoa* en la provincia de Misiones.

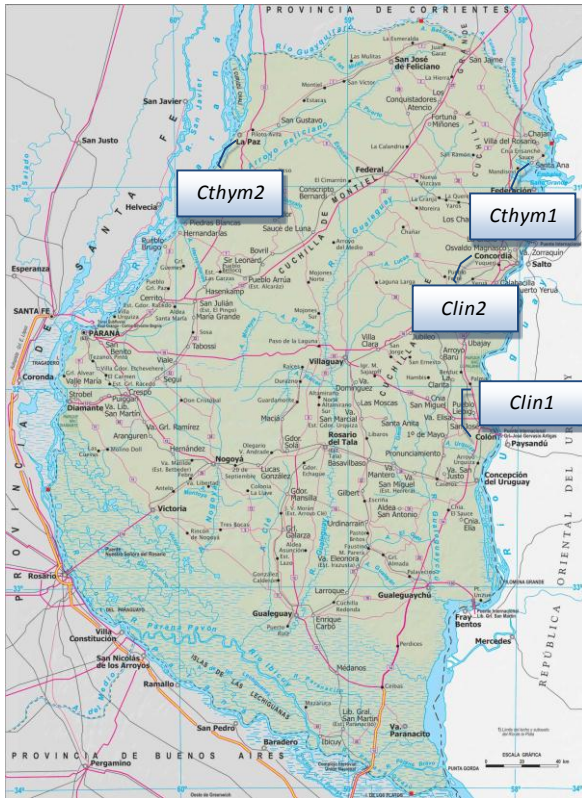


Figura 23: Ubicación de los individuos de *Calibrachoa* en la provincia de Entre Ríos.

## ANEXO II: NIVELES DE UNIÓN DE LAS ESPECIES NATIVAS DEL GÉNERO *CALIBRACHOA*

OTU	Level	OTU	Level	OTU	Level	OTU	Level
<b>Cexc1</b>	0.8147	<b>Cthym2</b>	0.8247	<b>Cpar1</b>	0.9165	<b>Cpub2</b>	0.8227
<b>Cexc2</b>	0.7968	<b>Cova1</b>	0.8398	<b>Cpar2</b>	0.8128	<b>Ccom1</b>	0.8322
<b>Cmis1</b>	0.8633	<b>Cova2</b>	0.8237	<b>Cpyg1</b>	0.8732	<b>Ccom2</b>	0.7894
<b>Cmis2</b>	0.8292	<b>Csp</b>	0.8178	<b>Cpyg2</b>	0.8036	<b>Ccae1</b>	0.8535
<b>Clin1</b>	0.8740	<b>Cirg</b>	0.8318	<b>Clon1</b>	0.8512	<b>Ccae2</b>	-----
<b>Clin2</b>	0.8443	<b>Chum1</b>	0.8565	<b>Clon2</b>	0.8016		
<b>Cthym1</b>	0.8633	<b>Chum2</b>	0.8068	<b>Cpub1</b>	0.8876		

**Tabla 18:** Niveles de unión del fenograma de las especies de *Calibrachoa*.

ANEXO III: TABLAS DE *LOCUS* TOTALES Y MATRICES DE SIMILITUD

<i>Locus</i>	Band Freq.	p	q	H'	PIC	UHe
<i>Locus1</i>	0,629	0,391	0,609	0,669	0,476	0,483
<i>Locus2</i>	0,771	0,522	0,478	0,692	0,499	0,506
<i>Locus3</i>	0,486	0,283	0,717	0,596	0,406	0,412
<i>Locus4</i>	0,571	0,345	0,655	0,645	0,452	0,459
<i>Locus5</i>	0,114	0,059	0,941	0,224	0,111	0,112
<i>Locus6</i>	0,800	0,553	0,447	0,688	0,494	0,502
<i>Locus7</i>	0,029	0,014	0,986	0,075	0,028	0,029
<i>Locus8</i>	0,029	0,014	0,986	0,075	0,028	0,029
<i>Locus9</i>	0,286	0,155	0,845	0,431	0,262	0,266
<i>Locus10</i>	0,686	0,439	0,561	0,686	0,493	0,500
<i>Locus11</i>	0,114	0,059	0,941	0,224	0,111	0,112
<i>Locus12</i>	0,057	0,029	0,971	0,131	0,056	0,057
<i>Locus13</i>	0,571	0,345	0,655	0,645	0,452	0,459
<i>Locus14</i>	0,743	0,493	0,507	0,693	0,500	0,507
<i>Locus15</i>	0,114	0,059	0,941	0,224	0,111	0,112
<i>Locus16</i>	0,486	0,283	0,717	0,596	0,406	0,412
<i>Locus17</i>	0,971	0,831	0,169	0,454	0,281	0,285
<i>Locus18</i>	0,057	0,029	0,971	0,131	0,056	0,057
<i>Locus19</i>	0,229	0,122	0,878	0,370	0,214	0,217
<i>Locus20</i>	0,029	0,014	0,986	0,075	0,028	0,029
<i>Locus21</i>	0,771	0,522	0,478	0,692	0,499	0,506
<i>Locus22</i>	0,057	0,029	0,971	0,131	0,056	0,057
<i>Locus23</i>	0,057	0,029	0,971	0,131	0,056	0,057
<i>Locus24</i>	0,200	0,106	0,894	0,337	0,189	0,192
<i>Locus25</i>	0,171	0,090	0,910	0,302	0,163	0,166
<i>Locus26</i>	0,057	0,029	0,971	0,131	0,056	0,057
<i>Locus27</i>	0,114	0,059	0,941	0,224	0,111	0,112
<i>Locus28</i>	0,971	0,831	0,169	0,454	0,281	0,285
<i>Locus29</i>	0,086	0,044	0,956	0,180	0,084	0,085
<i>Locus30</i>	0,114	0,059	0,941	0,224	0,111	0,112
<i>Locus31</i>	0,143	0,074	0,926	0,264	0,137	0,139
<i>Locus32</i>	0,086	0,044	0,956	0,180	0,084	0,085

<i>Locus33</i>	0,771	0,522	0,478	0,692	0,499	0,506
<i>Locus34</i>	0,114	0,059	0,941	0,224	0,111	0,112
<i>Locus35</i>	0,057	0,029	0,971	0,131	0,056	0,057
<i>Locus36</i>	0,286	0,155	0,845	0,431	0,262	0,266
<i>Locus37</i>	0,543	0,324	0,676	0,630	0,438	0,444
<i>Locus38</i>	0,143	0,074	0,926	0,264	0,137	0,139
<i>Locus39</i>	0,343	0,189	0,811	0,485	0,307	0,311
<i>Locus40</i>	0,143	0,074	0,926	0,264	0,137	0,139
<i>Locus41</i>	0,143	0,074	0,926	0,264	0,137	0,139
<i>Locus42</i>	0,057	0,029	0,971	0,131	0,056	0,057
<i>Locus43</i>	0,029	0,014	0,986	0,075	0,028	0,029
<i>Locus44</i>	0,457	0,263	0,737	0,576	0,388	0,393
<i>Locus45</i>	0,486	0,283	0,717	0,596	0,406	0,412
<i>Locus46</i>	0,229	0,122	0,878	0,370	0,214	0,217
<i>Locus47</i>	0,457	0,263	0,737	0,576	0,388	0,393
<i>Locus48</i>	0,029	0,014	0,986	0,075	0,028	0,029
<i>Locus49</i>	0,314	0,172	0,828	0,459	0,285	0,289
<i>Locus50</i>	0,057	0,029	0,971	0,131	0,056	0,057
<i>Locus51</i>	0,029	0,014	0,986	0,075	0,028	0,029
<i>Locus52</i>	0,029	0,014	0,986	0,075	0,028	0,029
<i>Locus53</i>	0,029	0,014	0,986	0,075	0,028	0,029
<i>Locus54</i>	0,171	0,090	0,910	0,302	0,163	0,166
<i>Locus55</i>	0,029	0,014	0,986	0,075	0,028	0,029
<i>Locus56</i>	0,457	0,263	0,737	0,576	0,388	0,393
<i>Locus57</i>	0,257	0,138	0,862	0,402	0,238	0,242
<i>Locus58</i>	0,057	0,029	0,971	0,131	0,056	0,057
<i>Locus59</i>	0,029	0,014	0,986	0,075	0,028	0,029
<i>Locus60</i>	0,114	0,059	0,941	0,224	0,111	0,112
<i>Locus61</i>	0,057	0,029	0,971	0,131	0,056	0,057
<i>Locus62</i>	0,171	0,090	0,910	0,302	0,163	0,166
<i>Locus63</i>	0,029	0,014	0,986	0,075	0,028	0,029
<i>Locus64</i>	0,229	0,122	0,878	0,370	0,214	0,217
<i>Locus65</i>	0,314	0,172	0,828	0,459	0,285	0,289
<i>Locus66</i>	0,114	0,059	0,941	0,224	0,111	0,112

<b>Locus67</b>	0,057	0,029	0,971	0,131	0,056	0,057
<b>Locus68</b>	0,171	0,090	0,910	0,302	0,163	0,166
<b>Locus69</b>	0,200	0,106	0,894	0,337	0,189	0,192
<b>Locus70</b>	0,229	0,122	0,878	0,370	0,214	0,217
<b>Locus71</b>	0,143	0,074	0,926	0,264	0,137	0,139
<b>Locus72</b>	0,057	0,029	0,971	0,131	0,056	0,057
<b>Locus73</b>	0,114	0,059	0,941	0,224	0,111	0,112
<b>Locus74</b>	0,086	0,044	0,956	0,180	0,084	0,085
<b>Locus75</b>	0,057	0,029	0,971	0,131	0,056	0,057
<b>Locus76</b>	0,286	0,155	0,845	0,431	0,262	0,266
<b>Locus77</b>	0,171	0,090	0,910	0,302	0,163	0,166
<b>Locus78</b>	0,257	0,138	0,862	0,402	0,238	0,242
<b>Locus79</b>	0,029	0,014	0,986	0,075	0,028	0,029
<b>Locus80</b>	0,057	0,029	0,971	0,131	0,056	0,057
<b>Locus81</b>	0,400	0,225	0,775	0,534	0,349	0,354
<b>Locus82</b>	0,029	0,014	0,986	0,075	0,028	0,029
<b>Locus83</b>	0,686	0,439	0,561	0,686	0,493	0,500
<b>Locus84</b>	0,143	0,074	0,926	0,264	0,137	0,139
<b>Locus85</b>	0,857	0,622	0,378	0,663	0,470	0,477
<b>Locus86</b>	0,286	0,155	0,845	0,431	0,262	0,266
<b>Locus87</b>	0,057	0,029	0,971	0,131	0,056	0,057
<b>Locus88</b>	0,143	0,074	0,926	0,264	0,137	0,139
<b>Locus89</b>	0,029	0,014	0,986	0,075	0,028	0,029
<b>Locus90</b>	0,914	0,707	0,293	0,605	0,414	0,420
<b>Locus91</b>	0,200	0,106	0,894	0,337	0,189	0,192
<b>Locus92</b>	0,114	0,059	0,941	0,224	0,111	0,112
<b>Locus93</b>	0,257	0,138	0,862	0,402	0,238	0,242
<b>Locus94</b>	0,114	0,059	0,941	0,224	0,111	0,112
<b>Locus95</b>	0,143	0,074	0,926	0,264	0,137	0,139
<b>Locus96</b>	0,057	0,029	0,971	0,131	0,056	0,057
<b>Locus97</b>	0,743	0,493	0,507	0,693	0,500	0,507
<b>Locus98</b>	0,029	0,014	0,986	0,075	0,028	0,029
<b>Locus99</b>	0,029	0,014	0,986	0,075	0,028	0,029
<b>Locus100</b>	0,114	0,059	0,941	0,224	0,111	0,112
<b>Locus101</b>	0,229	0,122	0,878	0,370	0,214	0,217
<b>Locus102</b>	0,657	0,414	0,586	0,678	0,485	0,492
<b>Locus103</b>	0,629	0,391	0,609	0,669	0,476	0,483
<b>Locus104</b>	0,114	0,059	0,941	0,224	0,111	0,112

<b>Locus105</b>	0,029	0,014	0,986	0,075	0,028	0,029
<b>Locus106</b>	0,171	0,090	0,910	0,302	0,163	0,166
<b>Locus107</b>	0,200	0,106	0,894	0,337	0,189	0,192
<b>Locus108</b>	0,286	0,155	0,845	0,431	0,262	0,266
<b>Locus109</b>	0,257	0,138	0,862	0,402	0,238	0,242
<b>Locus110</b>	0,029	0,014	0,986	0,075	0,028	0,029
<b>Locus111</b>	0,143	0,074	0,926	0,264	0,137	0,139
<b>Locus112</b>	0,057	0,029	0,971	0,131	0,056	0,057
<b>Locus113</b>	0,029	0,014	0,986	0,075	0,028	0,029
<b>Locus114</b>	0,371	0,207	0,793	0,510	0,329	0,333
<b>Locus115</b>	0,457	0,263	0,737	0,576	0,388	0,393
<b>Locus116</b>	0,086	0,044	0,956	0,180	0,084	0,085
<b>Locus117</b>	0,171	0,090	0,910	0,302	0,163	0,166
<b>Locus118</b>	0,114	0,059	0,941	0,224	0,111	0,112
<b>Locus119</b>	0,543	0,324	0,676	0,630	0,438	0,444
<b>Locus120</b>	0,029	0,014	0,986	0,075	0,028	0,029
<b>Locus121</b>	0,914	0,707	0,293	0,605	0,414	0,420
<b>Locus122</b>	0,086	0,044	0,956	0,180	0,084	0,085
<b>Locus123</b>	0,057	0,029	0,971	0,131	0,056	0,057
<b>Locus124</b>	0,571	0,345	0,655	0,645	0,452	0,459
<b>Locus125</b>	0,257	0,138	0,862	0,402	0,238	0,242
<b>Locus126</b>	0,229	0,122	0,878	0,370	0,214	0,217
<b>Locus127</b>	0,343	0,189	0,811	0,485	0,307	0,311
<b>Locus128</b>	0,457	0,263	0,737	0,576	0,388	0,393
<b>Locus129</b>	0,114	0,059	0,941	0,224	0,111	0,112
<b>Locus130</b>	0,086	0,044	0,956	0,180	0,084	0,085
<b>Locus131</b>	0,143	0,074	0,926	0,264	0,137	0,139
<b>Locus132</b>	0,114	0,059	0,941	0,224	0,111	0,112
<b>Locus133</b>	0,371	0,207	0,793	0,510	0,329	0,333
<b>Locus134</b>	0,086	0,044	0,956	0,180	0,084	0,085
<b>Locus135</b>	0,343	0,189	0,811	0,485	0,307	0,311
<b>Locus136</b>	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<b>Locus137</b>	0,686	0,439	0,561	0,686	0,493	0,500
<b>Locus138</b>	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<b>Locus139</b>	0,029	0,014	0,986	0,075	0,028	0,029
<b>Locus140</b>	0,057	0,029	0,971	0,131	0,056	0,057
<b>Locus141</b>	0,229	0,122	0,878	0,370	0,214	0,217
<b>Locus142</b>	0,114	0,059	0,941	0,224	0,111	0,112

<b>Locus143</b>	0,200	0,106	0,894	0,337	0,189	0,192
<b>Locus144</b>	0,371	0,207	0,793	0,510	0,329	0,333
<b>Locus145</b>	0,229	0,122	0,878	0,370	0,214	0,217
<b>Locus146</b>	0,371	0,207	0,793	0,510	0,329	0,333
<b>Locus147</b>	0,200	0,106	0,894	0,337	0,189	0,192
<b>Locus148</b>	0,371	0,207	0,793	0,510	0,329	0,333
<b>Locus149</b>	0,057	0,029	0,971	0,131	0,056	0,057
<b>Locus150</b>	0,029	0,014	0,986	0,075	0,028	0,029
<b>Locus151</b>	0,029	0,014	0,986	0,075	0,028	0,029
<b>Locus152</b>	0,114	0,059	0,941	0,224	0,111	0,112
<b>Locus153</b>	0,200	0,106	0,894	0,337	0,189	0,192
<b>Locus154</b>	0,371	0,207	0,793	0,510	0,329	0,333
<b>Locus155</b>	0,086	0,044	0,956	0,180	0,084	0,085
<b>Locus156</b>	0,086	0,044	0,956	0,180	0,084	0,085
<b>Locus157</b>	0,029	0,014	0,986	0,075	0,028	0,029
<b>Locus158</b>	0,057	0,029	0,971	0,131	0,056	0,057
<b>Locus159</b>	0,114	0,059	0,941	0,224	0,111	0,112
<b>Locus160</b>	0,343	0,189	0,811	0,485	0,307	0,311
<b>Locus161</b>	0,029	0,014	0,986	0,075	0,028	0,029
<b>Locus162</b>	0,029	0,014	0,986	0,075	0,028	0,029
<b>Locus163</b>	0,143	0,074	0,926	0,264	0,137	0,139
<b>Locus164</b>	0,486	0,283	0,717	0,596	0,406	0,412
<b>Locus165</b>	0,200	0,106	0,894	0,337	0,189	0,192
<b>Locus166</b>	0,029	0,014	0,986	0,075	0,028	0,029
<b>Locus167</b>	0,086	0,044	0,956	0,180	0,084	0,085
<b>Locus168</b>	0,029	0,014	0,986	0,075	0,028	0,029
<b>Locus169</b>	0,114	0,059	0,941	0,224	0,111	0,112
<b>Locus170</b>	0,171	0,090	0,910	0,302	0,163	0,166
<b>Locus171</b>	0,057	0,029	0,971	0,131	0,056	0,057
<b>Locus172</b>	0,400	0,225	0,775	0,534	0,349	0,354
<b>Locus173</b>	0,029	0,014	0,986	0,075	0,028	0,029
<b>Locus174</b>	0,029	0,014	0,986	0,075	0,028	0,029
<b>Locus175</b>	0,486	0,283	0,717	0,596	0,406	0,412
<b>Locus176</b>	0,029	0,014	0,986	0,075	0,028	0,029
<b>Locus177</b>	0,086	0,044	0,956	0,180	0,084	0,085
<b>Locus178</b>	0,086	0,044	0,956	0,180	0,084	0,085
<b>Locus179</b>	0,886	0,662	0,338	0,640	0,448	0,454
<b>Locus180</b>	0,029	0,014	0,986	0,075	0,028	0,029

<b>Locus181</b>	0,057	0,029	0,971	0,131	0,056	0,057
<b>Locus182</b>	0,086	0,044	0,956	0,180	0,084	0,085
<b>Locus183</b>	0,029	0,014	0,986	0,075	0,028	0,029
<b>Locus184</b>	0,543	0,324	0,676	0,630	0,438	0,444
<b>Locus185</b>	0,029	0,014	0,986	0,075	0,028	0,029
<b>Locus186</b>	0,371	0,207	0,793	0,510	0,329	0,333
<b>Locus187</b>	0,171	0,090	0,910	0,302	0,163	0,166
<b>Locus188</b>	0,086	0,044	0,956	0,180	0,084	0,085
<b>Locus189</b>	0,086	0,044	0,956	0,180	0,084	0,085
<b>Locus190</b>	0,257	0,138	0,862	0,402	0,238	0,242
<b>Locus191</b>	0,029	0,014	0,986	0,075	0,028	0,029
<b>Locus192</b>	0,029	0,014	0,986	0,075	0,028	0,029
<b>Locus193</b>	0,086	0,044	0,956	0,180	0,084	0,085
<b>Locus194</b>	0,057	0,029	0,971	0,131	0,056	0,057
<b>Locus195</b>	0,057	0,029	0,971	0,131	0,056	0,057
<b>Locus196</b>	0,114	0,059	0,941	0,224	0,111	0,112
<b>Locus197</b>	0,029	0,014	0,986	0,075	0,028	0,029
<b>Locus198</b>	0,029	0,014	0,986	0,075	0,028	0,029
<b>Locus199</b>	0,257	0,138	0,862	0,402	0,238	0,242
<b>Locus200</b>	0,457	0,263	0,737	0,576	0,388	0,393
<b>Locus201</b>	0,114	0,059	0,941	0,224	0,111	0,112
<b>Locus202</b>	0,171	0,090	0,910	0,302	0,163	0,166
<b>Locus203</b>	0,086	0,044	0,956	0,180	0,084	0,085
<b>Locus204</b>	0,029	0,014	0,986	0,075	0,028	0,029
<b>Locus205</b>	0,057	0,029	0,971	0,131	0,056	0,057
<b>Locus206</b>	0,143	0,074	0,926	0,264	0,137	0,139
<b>Locus207</b>	0,514	0,303	0,697	0,613	0,422	0,429
<b>Locus208</b>	0,457	0,263	0,737	0,576	0,388	0,393
<b>Locus209</b>	0,286	0,155	0,845	0,431	0,262	0,266
<b>Locus210</b>	0,114	0,059	0,941	0,224	0,111	0,112
<b>Locus211</b>	0,171	0,090	0,910	0,302	0,163	0,166
<b>Locus212</b>	0,371	0,207	0,793	0,510	0,329	0,333
<b>Locus213</b>	0,143	0,074	0,926	0,264	0,137	0,139
<b>Locus214</b>	0,486	0,283	0,717	0,596	0,406	0,412
<b>Locus215</b>	0,229	0,122	0,878	0,370	0,214	0,217
<b>Locus216</b>	0,229	0,122	0,878	0,370	0,214	0,217
<b>Locus217</b>	0,114	0,059	0,941	0,224	0,111	0,112
<b>Locus218</b>	0,286	0,155	0,845	0,431	0,262	0,266



<b>Locus219</b>	0,114	0,059	0,941	0,224	0,111	0,112
<b>Locus220</b>	0,800	0,553	0,447	0,688	0,494	0,502
<b>Locus221</b>	0,143	0,074	0,926	0,264	0,137	0,139
<b>Locus222</b>	0,257	0,138	0,862	0,402	0,238	0,242
<b>Locus223</b>	0,486	0,283	0,717	0,596	0,406	0,412
<b>Locus224</b>	0,029	0,014	0,986	0,075	0,028	0,029
<b>Locus225</b>	0,343	0,189	0,811	0,485	0,307	0,311
<b>Locus226</b>	0,143	0,074	0,926	0,264	0,137	0,139
<b>Locus227</b>	0,286	0,155	0,845	0,431	0,262	0,266
<b>Locus228</b>	0,371	0,207	0,793	0,510	0,329	0,333
<b>Locus229</b>	0,143	0,074	0,926	0,264	0,137	0,139
<b>Locus230</b>	0,457	0,263	0,737	0,576	0,388	0,393
<b>Locus231</b>	0,057	0,029	0,971	0,131	0,056	0,057
<b>Locus232</b>	0,571	0,345	0,655	0,645	0,452	0,459
<b>Locus233</b>	0,029	0,014	0,986	0,075	0,028	0,029
<b>Locus234</b>	0,229	0,122	0,878	0,370	0,214	0,217
<b>Locus235</b>	0,057	0,029	0,971	0,131	0,056	0,057
<b>Locus236</b>	0,171	0,090	0,910	0,302	0,163	0,166
<b>Locus237</b>	0,057	0,029	0,971	0,131	0,056	0,057
<b>Locus238</b>	0,200	0,106	0,894	0,337	0,189	0,192
<b>Locus239</b>	0,143	0,074	0,926	0,264	0,137	0,139
<b>Locus240</b>	0,171	0,090	0,910	0,302	0,163	0,166
<b>Locus241</b>	0,257	0,138	0,862	0,402	0,238	0,242
<b>Locus242</b>	0,057	0,029	0,971	0,131	0,056	0,057
<b>Locus243</b>	0,057	0,029	0,971	0,131	0,056	0,057
<b>Locus244</b>	0,114	0,059	0,941	0,224	0,111	0,112
<b>Locus245</b>	0,286	0,155	0,845	0,431	0,262	0,266
<b>Locus246</b>	0,029	0,014	0,986	0,075	0,028	0,029
<b>Locus247</b>	0,400	0,225	0,775	0,534	0,349	0,354
<b>Locus248</b>	0,114	0,059	0,941	0,224	0,111	0,112
<b>Locus249</b>	0,171	0,090	0,910	0,302	0,163	0,166
<b>Locus250</b>	0,086	0,044	0,956	0,180	0,084	0,085
<b>Locus251</b>	0,029	0,014	0,986	0,075	0,028	0,029
<b>Locus252</b>	0,086	0,044	0,956	0,180	0,084	0,085
<b>Locus253</b>	0,029	0,014	0,986	0,075	0,028	0,029
<b>Locus254</b>	0,400	0,225	0,775	0,534	0,349	0,354
<b>Locus255</b>	0,029	0,014	0,986	0,075	0,028	0,029
<b>Locus256</b>	0,114	0,059	0,941	0,224	0,111	0,112

<b>Locus257</b>	0,457	0,263	0,737	0,576	0,388	0,393
<b>Locus258</b>	0,029	0,014	0,986	0,075	0,028	0,029
<b>Locus259</b>	0,029	0,014	0,986	0,075	0,028	0,029
<b>Locus260</b>	0,486	0,283	0,717	0,596	0,406	0,412
<b>Locus261</b>	0,029	0,014	0,986	0,075	0,028	0,029
<b>Locus262</b>	0,057	0,029	0,971	0,131	0,056	0,057
<b>Locus263</b>	0,200	0,106	0,894	0,337	0,189	0,192
<b>Locus264</b>	0,029	0,014	0,986	0,075	0,028	0,029
<b>Locus265</b>	0,686	0,439	0,561	0,686	0,493	0,500
<b>Locus266</b>	0,200	0,106	0,894	0,337	0,189	0,192
<b>Locus267</b>	0,371	0,207	0,793	0,510	0,329	0,333
<b>Locus268</b>	0,629	0,391	0,609	0,669	0,476	0,483
<b>Locus269</b>	0,086	0,044	0,956	0,180	0,084	0,085
<b>Locus270</b>	0,971	0,831	0,169	0,454	0,281	0,285
<b>Locus271</b>	0,086	0,044	0,956	0,180	0,084	0,085
<b>Locus272</b>	0,743	0,493	0,507	0,693	0,500	0,507
<b>Locus273</b>	0,086	0,044	0,956	0,180	0,084	0,085
<b>Locus274</b>	0,686	0,439	0,561	0,686	0,493	0,500
<b>Locus275</b>	0,057	0,029	0,971	0,131	0,056	0,057
<b>Locus276</b>	0,314	0,172	0,828	0,459	0,285	0,289
<b>Locus277</b>	0,029	0,014	0,986	0,075	0,028	0,029
<b>Locus278</b>	0,029	0,014	0,986	0,075	0,028	0,029
<b>Locus279</b>	0,229	0,122	0,878	0,370	0,214	0,217
<b>Locus280</b>	0,057	0,029	0,971	0,131	0,056	0,057
<b>Locus281</b>	0,486	0,283	0,717	0,596	0,406	0,412
<b>Locus282</b>	0,314	0,172	0,828	0,459	0,285	0,289
<b>Locus283</b>	0,086	0,044	0,956	0,180	0,084	0,085
<b>Locus284</b>	0,029	0,014	0,986	0,075	0,028	0,029
<b>Locus285</b>	0,086	0,044	0,956	0,180	0,084	0,085
<b>Locus286</b>	0,114	0,059	0,941	0,224	0,111	0,112
<b>Locus287</b>	0,343	0,189	0,811	0,485	0,307	0,311
<b>Locus288</b>	0,143	0,074	0,926	0,264	0,137	0,139
<b>Locus289</b>	0,114	0,059	0,941	0,224	0,111	0,112
<b>Locus290</b>	0,086	0,044	0,956	0,180	0,084	0,085
<b>Locus291</b>	0,029	0,014	0,986	0,075	0,028	0,029
<b>Locus292</b>	0,829	0,586	0,414	0,678	0,485	0,492
<b>Locus293</b>	0,029	0,014	0,986	0,075	0,028	0,029
<b>Locus294</b>	0,286	0,155	0,845	0,431	0,262	0,266

<b>Locus295</b>	0,143	0,074	0,926	0,264	0,137	0,139
<b>Locus296</b>	0,086	0,044	0,956	0,180	0,084	0,085
<b>Locus297</b>	0,200	0,106	0,894	0,337	0,189	0,192
<b>Locus298</b>	0,457	0,263	0,737	0,576	0,388	0,393
<b>Locus299</b>	0,029	0,014	0,986	0,075	0,028	0,029
<b>Locus300</b>	0,914	0,707	0,293	0,605	0,414	0,420
<b>Locus301</b>	0,057	0,029	0,971	0,131	0,056	0,057
<b>Locus302</b>	0,057	0,029	0,971	0,131	0,056	0,057
<b>Locus303</b>	0,086	0,044	0,956	0,180	0,084	0,085
<b>Locus304</b>	0,057	0,029	0,971	0,131	0,056	0,057
<b>Locus305</b>	0,029	0,014	0,986	0,075	0,028	0,029
<b>Locus306</b>	0,200	0,106	0,894	0,337	0,189	0,192
<b>Locus307</b>	0,200	0,106	0,894	0,337	0,189	0,192
<b>Locus308</b>	0,029	0,014	0,986	0,075	0,028	0,029
<b>Locus309</b>	0,857	0,622	0,378	0,663	0,470	0,477
<b>Locus310</b>	0,057	0,029	0,971	0,131	0,056	0,057
<b>Locus311</b>	0,829	0,586	0,414	0,678	0,485	0,492
<b>Locus312</b>	0,086	0,044	0,956	0,180	0,084	0,085
<b>Locus313</b>	0,229	0,122	0,878	0,370	0,214	0,217
<b>Locus314</b>	0,171	0,090	0,910	0,302	0,163	0,166
<b>Locus315</b>	0,200	0,106	0,894	0,337	0,189	0,192
<b>Locus316</b>	0,029	0,014	0,986	0,075	0,028	0,029
<b>Locus317</b>	0,429	0,244	0,756	0,556	0,369	0,374
<b>Locus318</b>	0,057	0,029	0,971	0,131	0,056	0,057
<b>Locus319</b>	0,086	0,044	0,956	0,180	0,084	0,085
<b>Locus320</b>	0,057	0,029	0,971	0,131	0,056	0,057
<b>Locus321</b>	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<b>Locus322</b>	0,029	0,014	0,986	0,075	0,028	0,029
<b>Locus323</b>	0,171	0,090	0,910	0,302	0,163	0,166
<b>Locus324</b>	0,086	0,044	0,956	0,180	0,084	0,085
<b>Locus325</b>	0,486	0,283	0,717	0,596	0,406	0,412
<b>Locus326</b>	0,029	0,014	0,986	0,075	0,028	0,029
<b>Locus327</b>	0,029	0,014	0,986	0,075	0,028	0,029
<b>Locus328</b>	0,686	0,439	0,561	0,686	0,493	0,500
<b>Locus329</b>	0,029	0,014	0,986	0,075	0,028	0,029
<b>Locus330</b>	0,486	0,283	0,717	0,596	0,406	0,412
<b>Locus331</b>	0,257	0,138	0,862	0,402	0,238	0,242
<b>Locus332</b>	0,114	0,059	0,941	0,224	0,111	0,112

<b>Locus333</b>	0,686	0,439	0,561	0,686	0,493	0,500
<b>Locus334</b>	0,429	0,244	0,756	0,556	0,369	0,374
<b>Locus335</b>	0,114	0,059	0,941	0,224	0,111	0,112
<b>Locus336</b>	0,886	0,662	0,338	0,640	0,448	0,454
<b>Locus337</b>	0,057	0,029	0,971	0,131	0,056	0,057
<b>Locus338</b>	0,400	0,225	0,775	0,534	0,349	0,354
<b>Locus339</b>	0,400	0,225	0,775	0,534	0,349	0,354
<b>Locus340</b>	0,200	0,106	0,894	0,337	0,189	0,192
<b>Locus341</b>	0,457	0,263	0,737	0,576	0,388	0,393
<b>Locus342</b>	0,029	0,014	0,986	0,075	0,028	0,029
<b>Locus343</b>	0,029	0,014	0,986	0,075	0,028	0,029
<b>Locus344</b>	0,457	0,263	0,737	0,576	0,388	0,393
<b>Locus345</b>	0,429	0,244	0,756	0,556	0,369	0,374
<b>Locus346</b>	0,514	0,303	0,697	0,613	0,422	0,429
<b>Locus347</b>	0,171	0,090	0,910	0,302	0,163	0,166
<b>Locus348</b>	0,029	0,014	0,986	0,075	0,028	0,029
<b>Locus349</b>	0,057	0,029	0,971	0,131	0,056	0,057
<b>Locus350</b>	0,800	0,553	0,447	0,688	0,494	0,502
<b>Locus351</b>	0,086	0,044	0,956	0,180	0,084	0,085
<b>Locus352</b>	0,057	0,029	0,971	0,131	0,056	0,057
<b>Locus353</b>	0,743	0,493	0,507	0,693	0,500	0,507
<b>Locus354</b>	0,771	0,522	0,478	0,692	0,499	0,506
<b>Locus355</b>	0,029	0,014	0,986	0,075	0,028	0,029
<b>Locus356</b>	0,086	0,044	0,956	0,180	0,084	0,085
<b>Locus357</b>	0,029	0,014	0,986	0,075	0,028	0,029
<b>Locus358</b>	0,886	0,662	0,338	0,640	0,448	0,454
<b>Locus359</b>	0,029	0,014	0,986	0,075	0,028	0,029
<b>Locus360</b>	0,029	0,014	0,986	0,075	0,028	0,029
<b>Locus361</b>	0,029	0,014	0,986	0,075	0,028	0,029
<b>Locus362</b>	0,029	0,014	0,986	0,075	0,028	0,029
<b>Locus363</b>	0,029	0,014	0,986	0,075	0,028	0,029
<b>Locus364</b>	0,057	0,029	0,971	0,131	0,056	0,057
<b>Locus365</b>	0,029	0,014	0,986	0,075	0,028	0,029
<b>Locus366</b>	0,200	0,106	0,894	0,337	0,189	0,192
<b>Locus367</b>	0,686	0,439	0,561	0,686	0,493	0,500
<b>Locus368</b>	0,143	0,074	0,926	0,264	0,137	0,139
<b>Locus369</b>	0,029	0,014	0,986	0,075	0,028	0,029
<b>Locus370</b>	0,057	0,029	0,971	0,131	0,056	0,057

<b>Locus371</b>	0,086	0,044	0,956	0,180	0,084	0,085
<b>Locus372</b>	0,057	0,029	0,971	0,131	0,056	0,057
<b>Locus373</b>	0,200	0,106	0,894	0,337	0,189	0,192
<b>Locus374</b>	0,086	0,044	0,956	0,180	0,084	0,085
<b>Locus375</b>	0,343	0,189	0,811	0,485	0,307	0,311
<b>Locus376</b>	0,057	0,029	0,971	0,131	0,056	0,057
<b>Locus377</b>	0,857	0,622	0,378	0,663	0,470	0,477
<b>Locus378</b>	0,029	0,014	0,986	0,075	0,028	0,029
<b>Locus379</b>	0,086	0,044	0,956	0,180	0,084	0,085
<b>Locus380</b>	0,143	0,074	0,926	0,264	0,137	0,139
<b>Locus381</b>	0,571	0,345	0,655	0,645	0,452	0,459
<b>Locus382</b>	0,029	0,014	0,986	0,075	0,028	0,029
<b>Locus383</b>	0,914	0,707	0,293	0,605	0,414	0,420
<b>Locus384</b>	0,029	0,014	0,986	0,075	0,028	0,029
<b>Locus385</b>	0,029	0,014	0,986	0,075	0,028	0,029
<b>Locus386</b>	0,057	0,029	0,971	0,131	0,056	0,057
<b>Locus387</b>	0,143	0,074	0,926	0,264	0,137	0,139
<b>Locus388</b>	0,086	0,044	0,956	0,180	0,084	0,085
<b>Locus389</b>	0,029	0,014	0,986	0,075	0,028	0,029
<b>Locus390</b>	0,029	0,014	0,986	0,075	0,028	0,029
<b>Locus391</b>	0,029	0,014	0,986	0,075	0,028	0,029
<b>Locus392</b>	0,286	0,155	0,845	0,431	0,262	0,266
<b>Locus393</b>	0,257	0,138	0,862	0,402	0,238	0,242
<b>Locus394</b>	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<b>Locus395</b>	0,029	0,014	0,986	0,075	0,028	0,029
<b>Locus396</b>	0,029	0,014	0,986	0,075	0,028	0,029
<b>Locus397</b>	0,029	0,014	0,986	0,075	0,028	0,029
<b>Locus398</b>	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<b>Locus399</b>	0,057	0,029	0,971	0,131	0,056	0,057
<b>Locus400</b>	0,457	0,263	0,737	0,576	0,388	0,393
<b>Locus401</b>	0,086	0,044	0,956	0,180	0,084	0,085
<b>Locus402</b>	0,057	0,029	0,971	0,131	0,056	0,057
<b>Locus403</b>	0,029	0,014	0,986	0,075	0,028	0,029
<b>Locus404</b>	0,114	0,059	0,941	0,224	0,111	0,112
<b>Locus405</b>	0,086	0,044	0,956	0,180	0,084	0,085
<b>Locus406</b>	0,886	0,662	0,338	0,640	0,448	0,454
<b>Locus407</b>	0,200	0,106	0,894	0,337	0,189	0,192
<b>Locus408</b>	0,314	0,172	0,828	0,459	0,285	0,289

<b>Locus409</b>	0,029	0,014	0,986	0,075	0,028	0,029
<b>Locus410</b>	0,343	0,189	0,811	0,485	0,307	0,311
<b>Locus411</b>	0,057	0,029	0,971	0,131	0,056	0,057
<b>Locus412</b>	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<b>Locus413</b>	0,314	0,172	0,828	0,459	0,285	0,289
<b>Locus414</b>	0,314	0,172	0,828	0,459	0,285	0,289
<b>Locus415</b>	0,086	0,044	0,956	0,180	0,084	0,085
<b>Locus416</b>	0,057	0,029	0,971	0,131	0,056	0,057
<b>Locus417</b>	0,057	0,029	0,971	0,131	0,056	0,057
<b>Locus418</b>	0,057	0,029	0,971	0,131	0,056	0,057
<b>Locus419</b>	0,286	0,155	0,845	0,431	0,262	0,266
<b>Locus420</b>	0,114	0,059	0,941	0,224	0,111	0,112
<b>Locus421</b>	0,029	0,014	0,986	0,075	0,028	0,029
<b>Locus422</b>	0,029	0,014	0,986	0,075	0,028	0,029
<b>Locus423</b>	0,057	0,029	0,971	0,131	0,056	0,057
<b>Locus424</b>	0,029	0,014	0,986	0,075	0,028	0,029
<b>Locus425</b>	0,657	0,414	0,586	0,678	0,485	0,492
<b>Locus426</b>	0,029	0,014	0,986	0,075	0,028	0,029
<b>Locus427</b>	0,057	0,029	0,971	0,131	0,056	0,057
<b>Locus428</b>	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<b>Locus429</b>	0,029	0,014	0,986	0,075	0,028	0,029
<b>Locus430</b>	0,486	0,283	0,717	0,596	0,406	0,412
<b>Locus431</b>	0,257	0,138	0,862	0,402	0,238	0,242
<b>Locus432</b>	0,057	0,029	0,971	0,131	0,056	0,057
<b>Locus433</b>	0,086	0,044	0,956	0,180	0,084	0,085
<b>Locus434</b>	0,229	0,122	0,878	0,370	0,214	0,217
<b>Locus435</b>	0,171	0,090	0,910	0,302	0,163	0,166
<b>Locus436</b>	0,086	0,044	0,956	0,180	0,084	0,085
<b>Locus437</b>	0,114	0,059	0,941	0,224	0,111	0,112
<b>Locus438</b>	0,029	0,014	0,986	0,075	0,028	0,029
<b>Locus439</b>	0,257	0,138	0,862	0,402	0,238	0,242
<b>Locus440</b>	0,143	0,074	0,926	0,264	0,137	0,139
<b>Locus441</b>	0,171	0,090	0,910	0,302	0,163	0,166
<b>Locus442</b>	0,057	0,029	0,971	0,131	0,056	0,057
<b>Locus443</b>	0,171	0,090	0,910	0,302	0,163	0,166
<b>Locus444</b>	0,029	0,014	0,986	0,075	0,028	0,029
<b>Locus445</b>	0,029	0,014	0,986	0,075	0,028	0,029
<b>Locus446</b>	0,029	0,014	0,986	0,075	0,028	0,029

<b>Locus447</b>	0,057	0,029	0,971	0,131	0,056	0,057
<b>Locus448</b>	0,343	0,189	0,811	0,485	0,307	0,311
<b>Locus449</b>	0,057	0,029	0,971	0,131	0,056	0,057
<b>Locus450</b>	0,514	0,303	0,697	0,613	0,422	0,429
<b>Locus451</b>	0,057	0,029	0,971	0,131	0,056	0,057
<b>Locus452</b>	0,029	0,014	0,986	0,075	0,028	0,029
<b>Locus453</b>	0,086	0,044	0,956	0,180	0,084	0,085
<b>Locus454</b>	0,086	0,044	0,956	0,180	0,084	0,085
<b>Locus455</b>	0,400	0,225	0,775	0,534	0,349	0,354
<b>Locus456</b>	0,057	0,029	0,971	0,131	0,056	0,057
<b>Locus457</b>	0,086	0,044	0,956	0,180	0,084	0,085
<b>Locus458</b>	0,029	0,014	0,986	0,075	0,028	0,029
<b>Locus459</b>	0,657	0,414	0,586	0,678	0,485	0,492
<b>Locus460</b>	0,029	0,014	0,986	0,075	0,028	0,029
<b>Locus461</b>	0,143	0,074	0,926	0,264	0,137	0,139
<b>Locus462</b>	0,400	0,225	0,775	0,534	0,349	0,354
<b>Locus463</b>	0,029	0,014	0,986	0,075	0,028	0,029
<b>Locus464</b>	0,657	0,414	0,586	0,678	0,485	0,492
<b>Locus465</b>	0,057	0,029	0,971	0,131	0,056	0,057
<b>Locus466</b>	0,286	0,155	0,845	0,431	0,262	0,266
<b>Locus467</b>	0,171	0,090	0,910	0,302	0,163	0,166
<b>Locus468</b>	0,143	0,074	0,926	0,264	0,137	0,139
<b>Locus469</b>	0,429	0,244	0,756	0,556	0,369	0,374
<b>Locus470</b>	0,429	0,244	0,756	0,556	0,369	0,374
<b>Locus471</b>	0,029	0,014	0,986	0,075	0,028	0,029
<b>Locus472</b>	0,400	0,225	0,775	0,534	0,349	0,354
<b>Locus473</b>	0,200	0,106	0,894	0,337	0,189	0,192
<b>Locus474</b>	0,286	0,155	0,845	0,431	0,262	0,266
<b>Locus475</b>	0,086	0,044	0,956	0,180	0,084	0,085
<b>Locus476</b>	0,314	0,172	0,828	0,459	0,285	0,289
<b>Locus477</b>	0,143	0,074	0,926	0,264	0,137	0,139
<b>Locus478</b>	0,229	0,122	0,878	0,370	0,214	0,217
<b>Locus479</b>	0,029	0,014	0,986	0,075	0,028	0,029
<b>Locus480</b>	0,029	0,014	0,986	0,075	0,028	0,029
<b>Locus481</b>	0,086	0,044	0,956	0,180	0,084	0,085
<b>Locus482</b>	0,143	0,074	0,926	0,264	0,137	0,139
<b>Locus483</b>	0,057	0,029	0,971	0,131	0,056	0,057
<b>Locus484</b>	0,771	0,522	0,478	0,692	0,499	0,506

<b>Locus485</b>	0,314	0,172	0,828	0,459	0,285	0,289
<b>Locus486</b>	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<b>Locus487</b>	0,029	0,014	0,986	0,075	0,028	0,029
<b>Locus488</b>	0,086	0,044	0,956	0,180	0,084	0,085
<b>Locus489</b>	0,857	0,622	0,378	0,663	0,470	0,477
<b>Locus490</b>	0,057	0,029	0,971	0,131	0,056	0,057
<b>Locus491</b>	0,114	0,059	0,941	0,224	0,111	0,112
<b>Locus492</b>	0,114	0,059	0,941	0,224	0,111	0,112
<b>Locus493</b>	0,286	0,155	0,845	0,431	0,262	0,266
<b>Locus494</b>	0,114	0,059	0,941	0,224	0,111	0,112
<b>Locus495</b>	0,029	0,014	0,986	0,075	0,028	0,029
<b>Locus496</b>	0,429	0,244	0,756	0,556	0,369	0,374
<b>Locus497</b>	0,714	0,465	0,535	0,691	0,498	0,505
<b>Locus498</b>	0,229	0,122	0,878	0,370	0,214	0,217
<b>Locus499</b>	0,229	0,122	0,878	0,370	0,214	0,217
<b>Locus500</b>	0,857	0,622	0,378	0,663	0,470	0,477
<b>Locus501</b>	0,371	0,207	0,793	0,510	0,329	0,333
<b>Locus502</b>	0,829	0,586	0,414	0,678	0,485	0,492
<b>Locus503</b>	0,086	0,044	0,956	0,180	0,084	0,085
<b>Locus504</b>	0,257	0,138	0,862	0,402	0,238	0,242
<b>Locus505</b>	0,143	0,074	0,926	0,264	0,137	0,139
<b>Locus506</b>	0,114	0,059	0,941	0,224	0,111	0,112
<b>Locus507</b>	0,114	0,059	0,941	0,224	0,111	0,112
<b>Locus508</b>	0,171	0,090	0,910	0,302	0,163	0,166
<b>Locus509</b>	0,371	0,207	0,793	0,510	0,329	0,333
<b>Locus510</b>	0,057	0,029	0,971	0,131	0,056	0,057
<b>Locus511</b>	0,029	0,014	0,986	0,075	0,028	0,029
<b>Locus512</b>	0,914	0,707	0,293	0,605	0,414	0,420
<b>Locus513</b>	0,914	0,707	0,293	0,605	0,414	0,420
<b>Locus514</b>	0,714	0,465	0,535	0,691	0,498	0,505
<b>Locus515</b>	0,657	0,414	0,586	0,678	0,485	0,492
<b>Locus516</b>	0,114	0,059	0,941	0,224	0,111	0,112
<b>Locus517</b>	0,029	0,014	0,986	0,075	0,028	0,029
<b>Locus518</b>	0,086	0,044	0,956	0,180	0,084	0,085
<b>Locus519</b>	0,057	0,029	0,971	0,131	0,056	0,057
<b>Locus520</b>	0,029	0,014	0,986	0,075	0,028	0,029
<b>Locus521</b>	0,086	0,044	0,956	0,180	0,084	0,085
<b>Locus522</b>	0,857	0,622	0,378	0,663	0,470	0,477

<b>Locus523</b>	0,171	0,090	0,910	0,302	0,163	0,166
<b>Locus524</b>	0,029	0,014	0,986	0,075	0,028	0,029
<b>Locus525</b>	0,029	0,014	0,986	0,075	0,028	0,029
<b>Locus526</b>	0,943	0,761	0,239	0,550	0,364	0,369
<b>Locus527</b>	0,029	0,014	0,986	0,075	0,028	0,029
<b>Locus528</b>	0,029	0,014	0,986	0,075	0,028	0,029
<b>Locus529</b>	0,029	0,014	0,986	0,075	0,028	0,029
<b>Locus530</b>	0,029	0,014	0,986	0,075	0,028	0,029
<b>Locus531</b>	0,029	0,014	0,986	0,075	0,028	0,029
<b>Locus532</b>	0,029	0,014	0,986	0,075	0,028	0,029
<b>Locus533</b>	0,143	0,074	0,926	0,264	0,137	0,139
<b>Locus534</b>	0,057	0,029	0,971	0,131	0,056	0,057
<b>Locus535</b>	0,229	0,122	0,878	0,370	0,214	0,217
<b>Locus536</b>	0,114	0,059	0,941	0,224	0,111	0,112
<b>Locus537</b>	0,143	0,074	0,926	0,264	0,137	0,139
<b>Locus538</b>	0,286	0,155	0,845	0,431	0,262	0,266
<b>Locus539</b>	0,229	0,122	0,878	0,370	0,214	0,217
<b>Locus540</b>	0,114	0,059	0,941	0,224	0,111	0,112
<b>Locus541</b>	0,029	0,014	0,986	0,075	0,028	0,029
<b>Locus542</b>	0,171	0,090	0,910	0,302	0,163	0,166
<b>Locus543</b>	0,057	0,029	0,971	0,131	0,056	0,057
<b>Locus544</b>	0,714	0,465	0,535	0,691	0,498	0,505
<b>Locus545</b>	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<b>Locus546</b>	0,114	0,059	0,941	0,224	0,111	0,112
<b>Locus547</b>	0,914	0,707	0,293	0,605	0,414	0,420
<b>Locus548</b>	0,886	0,662	0,338	0,640	0,448	0,454
<b>Locus549</b>	0,029	0,014	0,986	0,075	0,028	0,029
<b>Locus550</b>	0,114	0,059	0,941	0,224	0,111	0,112
<b>Locus551</b>	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<b>Locus552</b>	0,057	0,029	0,971	0,131	0,056	0,057
<b>Locus553</b>	0,200	0,106	0,894	0,337	0,189	0,192
<b>Locus554</b>	0,057	0,029	0,971	0,131	0,056	0,057
<b>Locus555</b>	0,743	0,493	0,507	0,693	0,500	0,507
<b>Locus556</b>	0,029	0,014	0,986	0,075	0,028	0,029
<b>Locus557</b>	0,029	0,014	0,986	0,075	0,028	0,029
<b>Locus558</b>	0,057	0,029	0,971	0,131	0,056	0,057
<b>Locus559</b>	0,114	0,059	0,941	0,224	0,111	0,112
<b>Locus560</b>	0,286	0,155	0,845	0,431	0,262	0,266

<b>Locus561</b>	0,086	0,044	0,956	0,180	0,084	0,085
<b>Locus562</b>	0,057	0,029	0,971	0,131	0,056	0,057
<b>Locus563</b>	0,514	0,303	0,697	0,613	0,422	0,429
<b>Locus564</b>	0,143	0,074	0,926	0,264	0,137	0,139
<b>Locus565</b>	0,143	0,074	0,926	0,264	0,137	0,139
<b>Locus566</b>	0,429	0,244	0,756	0,556	0,369	0,374
<b>Locus567</b>	0,200	0,106	0,894	0,337	0,189	0,192
<b>Locus568</b>	0,029	0,014	0,986	0,075	0,028	0,029
<b>Locus569</b>	0,114	0,059	0,941	0,224	0,111	0,112
<b>Locus570</b>	0,848	0,611	0,389	0,668	0,475	0,483
<b>Locus571</b>	0,485	0,282	0,718	0,595	0,405	0,411
<b>Locus572</b>	0,171	0,090	0,910	0,302	0,163	0,166
<b>Locus573</b>	0,629	0,391	0,609	0,669	0,476	0,483
<b>Locus574</b>	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<b>Locus575</b>	0,143	0,074	0,926	0,264	0,137	0,139
<b>Locus576</b>	0,029	0,014	0,986	0,075	0,028	0,029
<b>Locus577</b>	0,143	0,074	0,926	0,264	0,137	0,139
<b>Locus578</b>	0,086	0,044	0,956	0,180	0,084	0,085
<b>Locus579</b>	0,086	0,044	0,956	0,180	0,084	0,085
<b>Locus580</b>	0,200	0,106	0,894	0,337	0,189	0,192
<b>Locus581</b>	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<b>Locus582</b>	0,286	0,155	0,845	0,431	0,262	0,266
<b>Locus583</b>	0,857	0,622	0,378	0,663	0,470	0,477
<b>Locus584</b>	0,029	0,014	0,986	0,075	0,028	0,029
<b>Locus585</b>	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<b>Locus586</b>	0,029	0,014	0,986	0,075	0,028	0,029
<b>Locus587</b>	0,029	0,014	0,986	0,075	0,028	0,029
<b>Locus588</b>	0,257	0,138	0,862	0,402	0,238	0,242
<b>Locus589</b>	0,143	0,074	0,926	0,264	0,137	0,139
<b>Locus590</b>	0,200	0,106	0,894	0,337	0,189	0,192
<b>Locus591</b>	0,086	0,044	0,956	0,180	0,084	0,085
<b>Locus592</b>	0,657	0,414	0,586	0,678	0,485	0,492
<b>Locus593</b>	0,086	0,044	0,956	0,180	0,084	0,085
<b>Locus594</b>	0,029	0,014	0,986	0,075	0,028	0,029
<b>Locus595</b>	0,257	0,138	0,862	0,402	0,238	0,242
<b>Locus596</b>	0,171	0,090	0,910	0,302	0,163	0,166
<b>Locus597</b>	0,229	0,122	0,878	0,370	0,214	0,217
<b>Locus598</b>	0,429	0,244	0,756	0,556	0,369	0,374

<b>Locus599</b>	0,257	0,138	0,862	0,402	0,238	0,242
<b>Locus600</b>	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<b>Locus601</b>	0,057	0,029	0,971	0,131	0,056	0,057
<b>Locus602</b>	0,029	0,014	0,986	0,075	0,028	0,029
<b>Locus603</b>	0,143	0,074	0,926	0,264	0,137	0,139
<b>Locus604</b>	0,029	0,014	0,986	0,075	0,028	0,029
<b>Locus605</b>	0,057	0,029	0,971	0,131	0,056	0,057
<b>Locus606</b>	0,143	0,074	0,926	0,264	0,137	0,139
<b>Locus607</b>	0,257	0,138	0,862	0,402	0,238	0,242
<b>Locus608</b>	0,200	0,106	0,894	0,337	0,189	0,192
<b>Locus609</b>	0,057	0,029	0,971	0,131	0,056	0,057
<b>Locus610</b>	0,029	0,014	0,986	0,075	0,028	0,029
<b>Locus611</b>	0,229	0,122	0,878	0,370	0,214	0,217
<b>Locus612</b>	0,171	0,090	0,910	0,302	0,163	0,166
<b>Locus613</b>	0,086	0,044	0,956	0,180	0,084	0,085
<b>Locus614</b>	0,029	0,014	0,986	0,075	0,028	0,029
<b>Locus615</b>	0,029	0,014	0,986	0,075	0,028	0,029
<b>Locus616</b>	0,029	0,014	0,986	0,075	0,028	0,029
<b>Locus617</b>	0,114	0,059	0,941	0,224	0,111	0,112
<b>Locus618</b>	0,086	0,044	0,956	0,180	0,084	0,085
<b>Locus619</b>	0,029	0,014	0,986	0,075	0,028	0,029
<b>Locus620</b>	0,143	0,074	0,926	0,264	0,137	0,139
<b>Locus621</b>	0,086	0,044	0,956	0,180	0,084	0,085
<b>Locus622</b>	0,029	0,014	0,986	0,075	0,028	0,029
<b>Locus623</b>	0,857	0,622	0,378	0,663	0,470	0,477
<b>Locus624</b>	0,057	0,029	0,971	0,131	0,056	0,057
<b>Locus625</b>	0,029	0,014	0,986	0,075	0,028	0,029
<b>Locus626</b>	0,057	0,029	0,971	0,131	0,056	0,057
<b>Locus627</b>	0,857	0,622	0,378	0,663	0,470	0,477
<b>Locus628</b>	0,057	0,029	0,971	0,131	0,056	0,057
<b>Locus629</b>	0,029	0,014	0,986	0,075	0,028	0,029
<b>Locus630</b>	0,029	0,014	0,986	0,075	0,028	0,029
<b>Locus631</b>	0,057	0,029	0,971	0,131	0,056	0,057
<b>Locus632</b>	0,114	0,059	0,941	0,224	0,111	0,112
<b>Locus633</b>	0,457	0,263	0,737	0,576	0,388	0,393
<b>Locus634</b>	0,086	0,044	0,956	0,180	0,084	0,085
<b>Locus635</b>	0,086	0,044	0,956	0,180	0,084	0,085
<b>Locus636</b>	0,086	0,044	0,956	0,180	0,084	0,085

<b>Locus637</b>	0,057	0,029	0,971	0,131	0,056	0,057
<b>Locus638</b>	0,200	0,106	0,894	0,337	0,189	0,192
<b>Locus639</b>	0,029	0,014	0,986	0,075	0,028	0,029
<b>Locus640</b>	0,029	0,014	0,986	0,075	0,028	0,029
<b>Locus641</b>	0,029	0,014	0,986	0,075	0,028	0,029
<b>Locus642</b>	0,029	0,014	0,986	0,075	0,028	0,029
<b>Locus643</b>	0,086	0,044	0,956	0,180	0,084	0,085
<b>Locus644</b>	0,029	0,014	0,986	0,075	0,028	0,029
<b>Locus645</b>	0,686	0,439	0,561	0,686	0,493	0,500
<b>Locus646</b>	0,143	0,074	0,926	0,264	0,137	0,139
<b>Locus647</b>	0,029	0,014	0,986	0,075	0,028	0,029
<b>Locus648</b>	0,057	0,029	0,971	0,131	0,056	0,057
<b>Locus649</b>	0,229	0,122	0,878	0,370	0,214	0,217
<b>Locus650</b>	0,029	0,014	0,986	0,075	0,028	0,029
<b>Locus651</b>	0,086	0,044	0,956	0,180	0,084	0,085
<b>Locus652</b>	0,171	0,090	0,910	0,302	0,163	0,166
<b>Locus653</b>	0,057	0,029	0,971	0,131	0,056	0,057
<b>Locus654</b>	0,114	0,059	0,941	0,224	0,111	0,112
<b>Locus655</b>	0,029	0,014	0,986	0,075	0,028	0,029
<b>Locus656</b>	0,029	0,014	0,986	0,075	0,028	0,029
<b>Locus657</b>	0,200	0,106	0,894	0,337	0,189	0,192
<b>Locus658</b>	0,600	0,368	0,632	0,658	0,465	0,472
<b>Locus659</b>	0,029	0,014	0,986	0,075	0,028	0,029
<b>Locus660</b>	0,257	0,138	0,862	0,402	0,238	0,242
<b>Locus661</b>	0,143	0,074	0,926	0,264	0,137	0,139
<b>Locus662</b>	0,057	0,029	0,971	0,131	0,056	0,057
<b>Locus663</b>	0,114	0,059	0,941	0,224	0,111	0,112
<b>Locus664</b>	0,114	0,059	0,941	0,224	0,111	0,112
<b>Locus665</b>	0,057	0,029	0,971	0,131	0,056	0,057
<b>Locus666</b>	0,629	0,391	0,609	0,669	0,476	0,483
<b>Locus667</b>	0,057	0,029	0,971	0,131	0,056	0,057
<b>Locus668</b>	0,114	0,059	0,941	0,224	0,111	0,112
<b>Locus669</b>	0,371	0,207	0,793	0,510	0,329	0,333
<b>Locus670</b>	0,029	0,014	0,986	0,075	0,028	0,029
<b>Locus671</b>	0,257	0,138	0,862	0,402	0,238	0,242
<b>Locus672</b>	0,029	0,014	0,986	0,075	0,028	0,029
<b>Locus673</b>	0,057	0,029	0,971	0,131	0,056	0,057
<b>Locus674</b>	0,200	0,106	0,894	0,337	0,189	0,192

<b>Locus675</b>	0,086	0,044	0,956	0,180	0,084	0,085
<b>Locus676</b>	0,057	0,029	0,971	0,131	0,056	0,057
<b>Locus677</b>	0,200	0,106	0,894	0,337	0,189	0,192
<b>Locus678</b>	0,143	0,074	0,926	0,264	0,137	0,139
<b>Locus679</b>	0,114	0,059	0,941	0,224	0,111	0,112
<b>Locus680</b>	0,029	0,014	0,986	0,075	0,028	0,029
<b>Locus681</b>	0,086	0,044	0,956	0,180	0,084	0,085
<b>Locus682</b>	0,086	0,044	0,956	0,180	0,084	0,085
<b>Locus683</b>	0,343	0,189	0,811	0,485	0,307	0,311
<b>Locus684</b>	0,400	0,225	0,775	0,534	0,349	0,354
<b>Locus685</b>	0,029	0,014	0,986	0,075	0,028	0,029
<b>Locus686</b>	0,057	0,029	0,971	0,131	0,056	0,057
<b>Locus687</b>	0,143	0,074	0,926	0,264	0,137	0,139
<b>Locus688</b>	0,057	0,029	0,971	0,131	0,056	0,057
<b>Locus689</b>	0,029	0,014	0,986	0,075	0,028	0,029
<b>Locus690</b>	0,286	0,155	0,845	0,431	0,262	0,266
<b>Locus691</b>	0,314	0,172	0,828	0,459	0,285	0,289
<b>Locus692</b>	0,171	0,090	0,910	0,302	0,163	0,166
<b>Locus693</b>	0,029	0,014	0,986	0,075	0,028	0,029
<b>Locus694</b>	0,029	0,014	0,986	0,075	0,028	0,029
<b>Locus695</b>	0,029	0,014	0,986	0,075	0,028	0,029
<b>Locus696</b>	0,029	0,014	0,986	0,075	0,028	0,029
<b>Locus697</b>	0,029	0,014	0,986	0,075	0,028	0,029
<b>Locus698</b>	0,429	0,244	0,756	0,556	0,369	0,374
<b>Locus699</b>	0,029	0,014	0,986	0,075	0,028	0,029
<b>Locus700</b>	0,029	0,014	0,986	0,075	0,028	0,029
<b>Locus701</b>	0,029	0,014	0,986	0,075	0,028	0,029

Tabla 19: *Locus* totales de los individuos de *C. caesia* analizados. Band Freq: Frecuencia de la banda, p: presencia, q: ausencia, H': Índice de Shannon, PIC: contenido de información polimórfica o índice de diversidad, UHe: Heterocigosidad esperada imparcial.

	<i>Ccae1</i>	<i>Ccae2</i>	<i>Ccae3</i>	<i>Ccae4</i>	<i>Ccae5</i>	<i>Ccae6</i>	<i>Ccae7</i>	<i>Ccae8</i>	<i>Ccae9</i>	<i>Ccae10</i>	<i>Ccae11</i>	<i>Ccae12</i>	<i>Ccae13</i>	<i>Ccae14</i>	<i>Ccae15</i>	<i>Ccae16</i>	<i>Ccae17</i>	<i>Ccae18</i>
<i>Ccae1</i>	1,0000																	
<i>Ccae2</i>	0,3349	1,0000																
<i>Ccae3</i>	0,3861	0,4484	1,0000															
<i>Ccae4</i>	0,3545	0,4573	0,5336	1,0000														
<i>Ccae5</i>	0,3180	0,4688	0,4163	0,5398	1,0000													
<i>Ccae6</i>	0,4167	0,3877	0,4429	0,4397	0,4185	1,0000												
<i>Ccae7</i>	0,4536	0,4110	0,4352	0,4261	0,4107	0,5100	1,0000											
<i>Ccae8</i>	0,3565	0,3867	0,4071	0,4007	0,3507	0,4684	0,4741	1,0000										
<i>Ccae9</i>	0,3349	0,3932	0,3974	0,3968	0,3427	0,4115	0,4558	0,4418	1,0000									
<i>Ccae10</i>	0,3333	0,4072	0,3805	0,3983	0,3648	0,4340	0,4123	0,3651	0,4318	1,0000								
<i>Ccae11</i>	0,2863	0,3130	0,2825	0,2918	0,2857	0,3113	0,3135	0,3136	0,3083	0,3059	1,0000							
<i>Ccae12</i>	0,3172	0,3780	0,3505	0,3524	0,3409	0,4337	0,3959	0,3487	0,3333	0,4427	0,3305	1,0000						
<i>Ccae13</i>	0,3682	0,3707	0,4241	0,3868	0,3542	0,4465	0,4319	0,4153	0,3761	0,3406	0,2928	0,4200	1,0000					
<i>Ccae14</i>	0,2387	0,2927	0,3074	0,3012	0,3265	0,3178	0,3203	0,3097	0,2778	0,3290	0,2734	0,3209	0,2922	1,0000				
<i>Ccae15</i>	0,2978	0,3563	0,4000	0,3721	0,3465	0,3554	0,4123	0,3731	0,4184	0,3787	0,2935	0,3438	0,3678	0,3678	1,0000			
<i>Ccae16</i>	0,3088	0,3512	0,3898	0,3676	0,3975	0,3974	0,4144	0,4063	0,4329	0,3562	0,3022	0,3379	0,3922	0,3402	0,5044	1,0000		
<i>Ccae17</i>	0,3009	0,3846	0,4192	0,3887	0,3849	0,3605	0,3946	0,3784	0,4261	0,3491	0,2910	0,3122	0,4035	0,3061	0,4340	0,5161	1,0000	
<i>Ccae18</i>	0,3282	0,3604	0,3527	0,3544	0,3435	0,3721	0,3568	0,3563	0,3846	0,3535	0,2462	0,3333	0,3423	0,3070	0,3877	0,4213	0,4074	1,0000
<i>Ccae19</i>	0,2475	0,2939	0,2982	0,2661	0,2531	0,2632	0,2877	0,2863	0,3172	0,2851	0,2146	0,2794	0,2543	0,2436	0,3162	0,3158	0,3084	0,3750
<i>Ccae20</i>	0,3266	0,3348	0,3689	0,3306	0,3138	0,3333	0,3803	0,2977	0,3013	0,2870	0,2557	0,2757	0,3348	0,2072	0,3061	0,3220	0,3149	0,3411
<i>Ccae21</i>	0,3231	0,4333	0,4178	0,3502	0,3812	0,3548	0,3714	0,3254	0,3739	0,4010	0,2717	0,3979	0,3624	0,3084	0,3249	0,3304	0,4028	0,3192
<i>Ccae22</i>	0,3288	0,3577	0,3730	0,3422	0,3320	0,3856	0,4079	0,3849	0,4632	0,3571	0,3040	0,3158	0,3866	0,2548	0,3502	0,4125	0,4118	0,3193
<i>Ccae23</i>	0,3380	0,4017	0,4120	0,3992	0,3400	0,3718	0,3938	0,3571	0,3663	0,3208	0,2635	0,3067	0,3787	0,2366	0,3373	0,3373	0,4043	0,3276
<i>Ccae24</i>	0,3027	0,3088	0,3555	0,2869	0,2586	0,3005	0,3416	0,2680	0,3091	0,3350	0,2439	0,2872	0,3009	0,2217	0,2790	0,2844	0,3105	0,2990
<i>Ccae25</i>	0,2958	0,3750	0,3675	0,3852	0,3640	0,3805	0,3846	0,3750	0,3515	0,3568	0,2868	0,3443	0,3347	0,2600	0,3441	0,3500	0,3660	0,3653
<i>Ccae26</i>	0,2692	0,3710	0,3586	0,3346	0,2948	0,3427	0,3457	0,3274	0,3543	0,3539	0,2792	0,3247	0,3176	0,2679	0,3789	0,3168	0,3465	0,3502
<i>Ccae27</i>	0,2844	0,3333	0,3704	0,3245	0,3452	0,3430	0,3292	0,2943	0,3386	0,3156	0,2688	0,3070	0,3173	0,2567	0,3372	0,3216	0,3468	0,3506



<b>Ccae28</b>	0,3000	0,3504	0,3489	0,2934	0,3130	0,3205	0,3174	0,3071	0,3389	0,3203	0,2426	0,2995	0,2893	0,2430	0,3429	0,3487	0,3418	0,3578
<b>Ccae29</b>	0,2347	0,2611	0,2371	0,2490	0,2575	0,2523	0,2593	0,2137	0,2350	0,2545	0,2231	0,2600	0,2646	0,1750	0,2355	0,2554	0,2468	0,2667
<b>Ccae30</b>	0,2910	0,3459	0,3396	0,3228	0,2852	0,3448	0,3800	0,3624	0,3558	0,3244	0,2752	0,3556	0,3460	0,2292	0,3297	0,2964	0,3284	0,3152
<b>Ccae31</b>	0,2893	0,3654	0,3745	0,3405	0,2929	0,3385	0,3680	0,3566	0,3496	0,3333	0,2694	0,3544	0,3552	0,2581	0,3579	0,2996	0,3173	0,3241
<b>Ccae32</b>	0,2995	0,3598	0,3932	0,3282	0,3020	0,3707	0,3805	0,3459	0,3708	0,3476	0,2804	0,3349	0,3487	0,2840	0,3574	0,3360	0,3568	0,3090
<b>Ccae33</b>	0,2983	0,3643	0,3735	0,3540	0,3247	0,3911	0,3725	0,3750	0,3536	0,3478	0,2765	0,3532	0,3333	0,2563	0,3419	0,3371	0,3460	0,3333
<b>Ccae34</b>	0,2146	0,2116	0,2311	0,2292	0,2254	0,2284	0,2455	0,1861	0,2489	0,2112	0,1805	0,2113	0,2101	0,1901	0,2200	0,2172	0,2049	0,2089
<b>Ccae35</b>	0,2135	0,2321	0,2257	0,1992	0,2198	0,2396	0,2464	0,1794	0,2281	0,2100	0,2016	0,2539	0,2089	0,1982	0,2092	0,2112	0,2193	0,2075
<b>Vic</b>	0,0602	0,0762	0,0724	0,1026	0,0993	0,0743	0,0612	0,0915	0,0787	0,0608	0,0844	0,0699	0,0629	0,0881	0,0764	0,0784	0,0721	0,0590

	<b>Ccae19</b>	<b>Ccae20</b>	<b>Ccae21</b>	<b>Ccae22</b>	<b>Ccae23</b>	<b>Ccae24</b>	<b>Ccae25</b>	<b>Ccae26</b>	<b>Ccae27</b>	<b>Ccae28</b>	<b>Ccae29</b>	<b>Ccae30</b>	<b>Ccae31</b>	<b>Ccae32</b>	<b>Ccae33</b>	<b>Ccae34</b>	<b>Ccae35</b>	<b>Vic</b>
<b>Ccae19</b>	1,0000																	
<b>Ccae20</b>	0,2556	1,0000																
<b>Ccae21</b>	0,2685	0,3302	1,0000															
<b>Ccae22</b>	0,3008	0,3237	0,3728	1,0000														
<b>Ccae23</b>	0,3144	0,3263	0,3829	0,3878	1,0000													
<b>Ccae24</b>	0,3081	0,2919	0,3200	0,3578	0,3488	1,0000												
<b>Ccae25</b>	0,3333	0,2991	0,3013	0,3240	0,4069	0,3178	1,0000											
<b>Ccae26</b>	0,3151	0,2897	0,2915	0,3333	0,3730	0,2949	0,5045	1,0000										
<b>Ccae27</b>	0,3616	0,3208	0,3067	0,3651	0,4025	0,2826	0,3941	0,4463	1,0000									
<b>Ccae28</b>	0,3697	0,2918	0,2996	0,3554	0,3473	0,3113	0,3911	0,3745	0,4619	1,0000								
<b>Ccae29</b>	0,2500	0,2488	0,2559	0,2585	0,3049	0,2938	0,2691	0,2667	0,2596	0,3037	1,0000							
<b>Ccae30</b>	0,2780	0,2751	0,3268	0,3504	0,4331	0,2549	0,3813	0,4462	0,3731	0,3643	0,2996	1,0000						
<b>Ccae31</b>	0,3016	0,3077	0,3468	0,3849	0,4102	0,2980	0,3696	0,4237	0,3931	0,3960	0,3074	0,6157	1,0000					
<b>Ccae32</b>	0,2957	0,2917	0,3451	0,3644	0,4206	0,2857	0,3644	0,4232	0,3730	0,3691	0,3196	0,4979	0,5565	1,0000				
<b>Ccae33</b>	0,3052	0,3320	0,3293	0,3893	0,4150	0,2560	0,3686	0,4231	0,3870	0,3622	0,3235	0,5582	0,5844	0,5570	1,0000			
<b>Ccae34</b>	0,1883	0,2096	0,2546	0,2614	0,2213	0,2319	0,2143	0,2205	0,1984	0,1770	0,2019	0,2285	0,2548	0,2500	0,3036	1,0000		
<b>Ccae35</b>	0,2029	0,1918	0,2624	0,2308	0,2423	0,1900	0,2639	0,2458	0,2328	0,2385	0,1773	0,2430	0,2510	0,2400	0,2389	0,3516	1,0000	
<b>Vic</b>	0,0605	0,0580	0,0742	0,0871	0,0712	0,0509	0,0952	0,0854	0,0703	0,0633	0,0623	0,0744	0,1049	0,0789	0,1025	0,0846	0,0772	1,0000

Tabla 20: Matriz de similitud de los individuos de la colección de *C. caesia*, según el coeficiente de SM.

	<i>Cexc1</i>	<i>Cexc2</i>	<i>Cmis1</i>	<i>Cmis2</i>	<i>Ccae1</i>	<i>Ccae2</i>	<i>Cirg</i>	<i>Csp</i>	<i>Cpar1</i>	<i>Cpar2</i>	<i>Cova1</i>	<i>Cova2</i>	<i>Cpub1</i>	<i>Cpub2</i>	<i>Cpyg1</i>	<i>Cpyg2</i>	<i>Clon1</i>	<i>Clon2</i>	<i>Chum1</i>	<i>Chum2</i>	<i>Clin1</i>	<i>Clin2</i>	<i>Cthym1</i>	<i>Cthym2</i>	<i>Ccom1</i>	<i>Ccom2</i>	
<b><i>Cexc1</i></b>	1,0000																										
<b><i>Cexc2</i></b>	0,8147	1,0000																									
<b><i>Cmis1</i></b>	0,8140	0,8170	1,0000																								
<b><i>Cmis2</i></b>	0,8018	0,8079	0,8633	1,0000																							
<b><i>Ccae1</i></b>	0,7631	0,7859	0,8033	0,7882	1,0000																						
<b><i>Ccae2</i></b>	0,7775	0,7897	0,8056	0,7920	0,8535	1,0000																					
<b><i>Cirg</i></b>	0,7920	0,8117	0,8276	0,8155	0,7935	0,8003	1,0000																				
<b><i>Csp</i></b>	0,7844	0,7935	0,8322	0,8079	0,7798	0,7957	0,8314	1,0000																			
<b><i>Cpar1</i></b>	0,7950	0,8102	0,8140	0,7957	0,7920	0,8079	0,8254	0,8102	1,0000																		
<b><i>Cpar2</i></b>	0,7844	0,7965	0,7897	0,7715	0,7783	0,7897	0,7995	0,7904	0,9165	1,0000																	
<b><i>Cova1</i></b>	0,7995	0,8162	0,8337	0,8125	0,7874	0,7942	0,8238	0,8284	0,8254	0,8041	1,0000																
<b><i>Cova2</i></b>	0,8125	0,7927	0,8421	0,8117	0,7927	0,8087	0,8155	0,8170	0,8155	0,7988	0,8398	1,0000															
<b><i>Cpub1</i></b>	0,7715	0,7866	0,8147	0,7904	0,7836	0,7935	0,8094	0,8064	0,8155	0,7866	0,8003	0,8071	1,0000														
<b><i>Cpub2</i></b>	0,7882	0,7897	0,8178	0,8011	0,7882	0,8011	0,8094	0,8125	0,8185	0,7897	0,8155	0,8178	0,8876	1,0000													
<b><i>Cpyg1</i></b>	0,7844	0,7965	0,8018	0,7957	0,7798	0,7806	0,8011	0,7980	0,8147	0,8087	0,8011	0,7973	0,7866	0,8064	1,0000												
<b><i>Cpyg2</i></b>	0,7836	0,8033	0,8132	0,8011	0,7927	0,7889	0,8276	0,8140	0,8170	0,8109	0,8079	0,8132	0,7904	0,8162	0,8732	1,0000											
<b><i>Clon1</i></b>	0,7866	0,7836	0,8056	0,7965	0,7821	0,7920	0,8109	0,7988	0,8155	0,7882	0,7973	0,8071	0,8011	0,8087	0,7836	0,7980	1,0000										
<b><i>Clon2</i></b>	0,7821	0,7957	0,8041	0,7980	0,7836	0,7859	0,8155	0,8140	0,8125	0,7882	0,7988	0,8071	0,8026	0,8147	0,7806	0,8011	0,8512	1,0000									
<b><i>Chum1</i></b>	0,7904	0,7844	0,8246	0,7927	0,7737	0,7806	0,8314	0,8132	0,8102	0,7889	0,8087	0,8003	0,8079	0,8049	0,7904	0,7988	0,8003	0,7973	1,0000								
<b><i>Chum2</i></b>	0,7942	0,7988	0,8178	0,7980	0,7836	0,7874	0,8322	0,8155	0,8155	0,7897	0,8049	0,8162	0,8041	0,8117	0,7866	0,8087	0,8132	0,8193	0,8565	1,0000							
<b><i>Clin1</i></b>	0,8140	0,8246	0,8345	0,8254	0,7866	0,8011	0,8216	0,8276	0,8216	0,8049	0,8246	0,8238	0,8178	0,8178	0,8094	0,8162	0,8071	0,8117	0,8155	0,8117	1,0000						
<b><i>Clin2</i></b>	0,8064	0,8155	0,8360	0,8314	0,7957	0,8102	0,8428	0,8459	0,8352	0,8079	0,8337	0,8238	0,8238	0,8238	0,8170	0,8269	0,8178	0,8132	0,8261	0,8314	0,8740	1,0000					
<b><i>Cthym1</i></b>	0,7942	0,7988	0,8223	0,8193	0,7790	0,7920	0,8200	0,8170	0,8018	0,7790	0,8094	0,8208	0,7965	0,8056	0,7988	0,8011	0,7889	0,7874	0,8140	0,8117	0,8405	0,8330	1,0000				
<b><i>Cthym2</i></b>	0,8155	0,8398	0,8330	0,8314	0,7973	0,8056	0,8352	0,8140	0,8368	0,8216	0,8231	0,8375	0,8178	0,8223	0,8216	0,8238	0,8254	0,8132	0,8231	0,8223	0,8557	0,8481	0,8633	1,0000			
<b><i>Ccom1</i></b>	0,7745	0,7882	0,8102	0,7889	0,7806	0,7950	0,8125	0,7957	0,8064	0,7821	0,7957	0,7995	0,8284	0,8345	0,7821	0,7980	0,8102	0,7995	0,7957	0,7950	0,8071	0,8162	0,7904	0,8117	1,0000		
<b><i>Ccom2</i></b>	0,7616	0,7783	0,7927	0,7745	0,7692	0,7775	0,8041	0,8011	0,8011	0,7737	0,7920	0,7866	0,8155	0,8125	0,7768	0,7882	0,7942	0,7866	0,7798	0,7912	0,8018	0,8079	0,7760	0,7988	0,8322	1,0000	

Tabla 21: Matriz de similitud de las especies de *Calibrachoa*, según el coeficiente de SM.

## ANEXO IV: REACTIVOS

### 1 M TRIS pH=8

Disolver 121 g de Tris-Base en aprox. 750 mL de H<sub>2</sub>O(d). Agregar HCl hasta llevar a pH. Completar con H<sub>2</sub>O(d) hasta 1000 mL. Autoclavar.

### 0,5 M EDTA pH=8

Disolver 186,12 g de Na<sub>2</sub>EDTA•2H<sub>2</sub>O (PM=372,24) en aprox. 750 mL de H<sub>2</sub>O(d). Agregar NaOH hasta llevar a pH. Completar con H<sub>2</sub>O(d) hasta 1000 mL. Autoclavar.

### 5M NaCl

Disolver 22,2 g de NaCl (PM=58,44) en H<sub>2</sub>O(d) hasta un volumen final de 1000 mL. Autoclavar.

### TE pH=8 (10 mM Tris pH=8, 1mM EDTA pH=8)

STOCK	50 mL	100 mL	500 mL	100 mL
1 M TRIS pH=8	0,5	1,0	5,0	10,0
0,5 M EDTA pH=8	0,1	0,2	1,0	2,0
H <sub>2</sub> O(d)	c.s.p.	c.s.p.	c.s.p.	c.s.p.

### Buffer de extracción pH=8

Reactivos	Cantidades
H <sub>2</sub> O (d) c.s.p.	200 mL
TRIS 1M pH=8	20 mL
EDTA 0,5M pH=8	20 mL
NaCl 5M	56 mL
CTAB	4g
PVP-40	1% p/v
β Mercapto-etanol <sup>1</sup>	2% v/v

Autoclavar. <sup>1</sup>El β Mercapto-etanol debe agregarse a la solución inmediatamente antes de usar. TRIS: Tris(hidroximetil)amino metano, EDTA: ácido etilendiamintetraacético, CTAB: bromuro de cetiltrimetilamonio, PVP: polivinil pirrolidona.

### Preparación de dNTPs

#### Solución madre:

Tomar 100  $\mu\text{L}$  de cada uno de los deoxinucleótidos trifosfato (dNTPs): dATP, dGTP, dTTP, dCTP (cc 100 mM) y llevar a 1000  $\mu\text{L}$  con  $\text{H}_2\text{O}$  (u.p.) estéril. Concentración final 10 mM.

#### Solución uso:

Tomar 10  $\mu\text{L}$  de la solución madre (10 mM) y llevar a 80  $\mu\text{L}$  con  $\text{H}_2\text{O}$  (u.p.) estéril. Concentración final 1,25 mM.

### Preparación de Iniciadores

#### Solución uso:

Tomar 20  $\mu\text{L}$  de la solución madre (cc 100  $\mu\text{M}$ ) y llevar a 100  $\mu\text{L}$  con TE pH=8 estéril. Concentración final 20  $\mu\text{M}$ .

## PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE ADN DE MUESTRAS LIOFILIZADAS

(según Pérez de la Torre, et al., 2010)

- Calcular la cantidad de *buffer* de extracción a utilizar (1,1 mL por muestra)
- Precalentar el *buffer* de extracción + 2%  $\beta$  mercaptoetanol (v/v) a 65°C.
- Agregar 30-40 mg de la muestra liofilizada en un tubo de 2 mL junto con 1000  $\mu\text{L}$  del *buffer* de extracción precalentado.
- Llevar al baño termostático (65°C) por 2 Hs con agitación constante.
- Agregar un volumen de Cloroformo/Octanol (24:1).
- Centrifugar 10 min a 12.000 RPM a 4°C. Separar sobrenadante (De ser necesario, repetir este paso centrifugando por 5 min)
- Precipitar con medio volumen de Isopropanol frío. Dejar a -20°C por 15 min, o bien a -20°C ON.
- Centrifugar a 13.500 RPM por 40 min a 4°C. Descartar sobrenadante. Secar invertido sobre papel absorbente.
- Resuspender en 250  $\mu\text{L}$  de TE 1X hasta disolver. De ser necesario llevar a baño termostático (55°C) hasta disolución total del ADN.
- Agregar 2,5  $\mu\text{L}$  de RNasa A (10 mg/mL) (1% del vol. de resuspensión). Dejar 30 min a 37°C ó 1 hora a temperatura ambiente.

- Agregar un volumen de Fenol:Cloroformo:Alcohol Isoamílico (25:24:1). Centrifugar 10 min a 13.500 RPM a 4°C. Separar la parte acuosa en un nuevo tubo de 1,5 mL. Reservar.
- Agregar un volumen de TE 1X al tubo que contiene la fase orgánica y la interfase. Centrifugar 10 min a 13.500 RPM a 4°C. Separar la parte acuosa y agregarla al tubo que contiene el 1<sup>er</sup> sobrenadante.
- Agregar un volumen de Cloroformo/Octanol (24:1). Centrifugar 10 min a 13.500 RPM a 4°C. Separar sobrenadante. Repetir este paso (de ser necesario) centrifugando por 5 min.
- Precipitar con 5% (volumen del sobrenadante) de NaCl 5M y medio volumen de Isopropanol frío.
- Dejar a -20°C por 15 min o a -20°C ON.
- Centrifugar 40 min a 13.500 RPM a 4°C. Descartar sobrenadante.
- Lavar 2 veces con 500 µL de etanol al 70% cada vez. Centrifugar a 13.500 RPM a 4°C por 2 min. Descartar sobrenadante. Secar invertido sobre papel absorbente.
- Resuspender en cantidad suficiente de TE 1X hasta disolver. De ser necesario llevar a baño termostático (55°C) por 5 min o hasta disolución total del ADN.
- Conservar a -20°C.

---

## BIBLIOGRAFÍA

- Agarwal, M., Shrivastava, N. y Padh, H.** 2008. Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. *Plant Cell Rep* 27:617–631. DOI 10.1007/s00299-008-0507-z
- Ajibade, S.R.; Weden, N.F.; Chite, S.M.** 2000. Inter-simple sequence repeat analysis of genetic relationships in the genus *Vigna*. *Euphytica*, 111: 47-55.
- Alderete, L., Mori, M., Kato, A. y Escandón, A.** 2006. Establishment of an *in vitro* micropropagation protocol for *Mecardonia tenella*. *Electronic Journal of Biotechnology* Vol. 9 No. 3, Special Issue. ISSN: 0717-3458E. DOI: 10.2225/vol9-issue3-fulltext-6.
- Alexander, J.A.; Liston, A.; Popovich, S.** 2004. Genetic diversity of the narrow endemic *Astragalus oniciformis* (Fabaceae). *Am. J. of Botany* 91: 2004-2012.
- Ando, T.; Kokubun, H.; Watanabe, H.; Tanaka, N.; Yukawa, T. Hashimoto, G., Marchesi, E.; Suárez, E. and Basualdo, I.** 2005. Phylogenetic Analysis of *Petunia sensu* Jussieu (Solanaceae) using Chloroplast DNA RFLP. *Annals of Botany* 96: 289-297.
- Arif, I., Bakir, M., Khan, H., Al Farhan, A., Al Homaidan, A., Bahkali, A., Al Sadoon, M. y Shobrak, M.** 2010. A Brief Review of Molecular Techniques to Assess Plant Diversity. *Int. J. Mol. Sci.* 11: 2079-2096. doi:10.3390/ijms11052079. ISSN 1422-0067.
- Bao, J., Corke, H. y Sun, M.** 2006. Analysis of genetic diversity and relationships in waxy rice (*Oryza sativa* L.) using AFLP and ISSR markers. *Genetic Resources and Crop Evolution* 53:323-330. DOI 10.1007 /s10722-004-6145-6.
- Bennett, M.D. y Leitch, I.J.** 2005. Nuclear DNA Amounts in Angiosperms: Progress, Problems and Prospects. *Annals of Botany* 95: 45–90, doi:10.1093/aob/mci003.
- Bhatia, R., Singh, K.P., Jhang T., Sharma, T.R.** 2009. Assessment of clonal fidelity of micropropagated *gerbera* plants by ISSR markers. *Scientia Horticulturae* 119: 208-211
- Blair, M.W., Panaud, O. y Mc Couch, S.R.** 1999. Inter-simple sequence repeat amplification for analysis of microsatellite motif frequency and fingerprinting in rice (*Oryza sativa* L.) *Theoretical Applied Genetics* 98: 780-792.

- Bologna, P., Facciuto, G., Coviella, A., Pannunzio, M.J. y Prina, A.R.** 2009. Flower characterization in *Calibrachoa* (Solanaceae) mutants induced by X rays. XVII Congreso Brasileiro de Floricultura y Plantas Ornamentales, IV Congreso Brasileiro de Cultivos de Tejidos de plantas. Aracaju, Brasil.
- Bonin, A., Ehrich, D. y Manel, S.** 2007. Statistical analysis of amplified fragment length polymorphism data: a toolbox for molecular ecologists and evolutionists. *Molecular Ecology* 16, 3737–3758. doi: 10.1111/j.1365-294X.2007.03435.x.
- Borém, A y Teixeira Caixeta, E.** 2006. Marcadores Moleculares. Borém, A y Teixeira Caixeta, E. Eds. Viçosa, MG. 374p. CDD 22.ed. 631.53.
- Bornet, B.; Branchard, M.** 2001. Nonanchored Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) Markers: Reproducible and Specific Tools for Genome Fingerprinting. Commentary. *Plant Molecular Biology Reporter*. Volumen 19: pp: 209–215.
- Boschi, C. y Molinari, J.** 1996. El desarrollo de la floricultura en Argentina. Evolución tecnológica y comercial. *Horticultura internacional*. Nº 14, pags. 107-113. ISSN 1134-4881. [http://www.mapa.es/ministerio/pags/biblioteca/revistas/pdf\\_hortint/hortint\\_1996\\_14\\_107\\_113.pdf](http://www.mapa.es/ministerio/pags/biblioteca/revistas/pdf_hortint/hortint_1996_14_107_113.pdf) (último acceso: diciembre 2010)
- Bugallo, V., Pannunzio, M.J., Soto, S., Coviella, M.A. y Facciuto, G.** 2008. Obtención de híbridos de *Passiflora alata* con *P. amethystina* y *P. caerulea*. 4to Congreso de Floricultura y Plantas Ornamentales, 10º Jornadas Nacionales de Floricultura. Corrientes, Argentina.
- Caetano-Anollés, G.** 2001. Plant Genotyping Using Arbitrarily Amplified DNA. En: R.J. Henry ed. *Plant Genotyping: the DNA Fingerprinting of Plants*. Capítulo 3.
- Capel, J., Santalla, M., Ferreira, J., de Ron, A. y Lozano, R.** 2000. Capítulo 7. Selección asistida por marcadores moleculares. En: Los marcadores genéticos en la mejora vegetal. Ed. Nuez, F y Carrillo, J.M. Editorial de la UPV. ISBN 84-7721-945-1. PP 355-381.
- Christopoulos, M., Rouskasb, D., Tsantili, E. y Bebelic, P.** 2010. Germplasm diversity and genetic relationships among walnut (*Junglans regia* L.) cultivars and Greek local selections revealed by Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) markers. *Scientia Horticulturae* 125: 584-592. doi: 10.1016/j.scienta.2010.05.006.
- Crawford, D.; Tago-Nakazawa, M.; Stuessy, T.F.; Anderson, G.; Bernardello, G.; Ruiz, E.; Jensen, R.; Baeza, C., Wolfe, A.; Silva, M.** 2001. Intersimple sequence repeat (ISSR) variation in *Lactoris*

*fernandeziana* (Lactoridaceae), a rare endemic of the Juan Fernández Archipelago, Chile. *Plant Species Biology* 16: 185-192.

**Crisci, J.V. y López Armengol, M.F.** 1983. Introducción a la teoría y práctica de la taxonomía numérica. Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos. Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico, Washington D.C. (Serie de Biología, N°26). 132 pp.

**Cubero, J. I.** 2003. Introducción a la mejora genética vegetal. Mundi-Prensa Libros. ISBN 8484760995, 9788484760993. 565 pp.

**Dawson, G.** 1979. Scrophulariaceae. En A. Burkart ed. *Fl. II. Entre Ríos*, Colecc. Ci. Inst. Nac. Technol. Agropecu. 6 (5a): 452-504.

**De Riek, J., Calsyn, E., Everaert, I., Van Bockstaele, E., De Loose, M.** 2001. AFLP based alternatives for the assessment of Distinctness, Uniformity and Stability of sugar beet varieties. *Theor Appl Genet* 103:1254–1265.

**de Vicente, M.C., López, C. and Fulton, T. (eds.)**. 2004. Genetic Diversity Analysis with Molecular Marker Data: Learning Module. International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI), Rome, Italy. [http://irc.igd.cornell.edu/MolecularMarkers/Sequence-tagged% 20sites.pdf](http://irc.igd.cornell.edu/MolecularMarkers/Sequence-tagged%20sites.pdf) (último acceso: julio 2010).

**Debener, T.** 2001. Molecular tools for modern ornamental plant breeding and selection. *ISHS. Act Hort* 552: 121-127.

**Debener, T.** 2002. Molecular markers as tool for analysis of genetic relatedness and selection in ornamentals. In *Breeding for Ornamental: Classical and Molecular approaches*. Ed A. Vainstein. pps: 329-345. Kluwer Academic Publisher.

**Dice, L. R.** 1945. Measures of the amount of ecologic association between species. *Ecology*, 26:297-302.

**Edwards, J. y McCouch S.** 2007. Cap. 3. Molecular markers for use in plant molecular breeding and germplasm evaluation. En: *Marker-Assisted Selection. Current status and future perspectives in crops, livestock, forestry and fish*. FAO. Guimarães, Ruane, Scherf, Sonnino y Dargie Eds. ISBN 978-92-5-105717-9.

**Edwards, K.J. y Mogg, R.** 2001. Plant Genotyping by Analysis of Single Nucleotide Polymorphisms. En: R.J. Henry ed. *Plant Genotyping: The DNA Fingerprinting of Plants*. Capítulo 1.



**Escandón, A.S.** 2004. Biotecnología en el Cultivo de Especies Ornamentales. En: Echenique, V.; Rubinstein, C. Y Mroginsky, L. eds. Biotecnología y Mejoramiento Vegetal. INTA, Buenos Aires, Argentina, pp.: 257-256.

**Escandón, A., Alderete, L. y Hagiwara, J.C.** 2007a. A new variety of *Mecardonia tenella*, a native plant from South America with ornamental potential, obtained by *in vitro* polyploidization. *Scientia Horticulturae* 115: 56-61.

**Escandón, A., Hagiwara, J.C., Alderete, L.** 2006. A new variety of *Bacopa monnieri* obtained by *in vitro* polyploidization. *Electronic Journal of Biotechnology*. Vol.9 No.3, Special Issue. ISSN: 0717-3458. DOI: 10.2225/vol9-issue3-fulltext-8.

**Escandón, A. S., Marinangelli, P. A. y Pérez de la Torre, M.** 2010. Avances de la biotecnología en cultivos ornamentales. En: G. Levitus, V. Echenique, C. Rubinstein, E. Hopp y L. Mroginski. Eds. Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II. Editorial INTA. Parte V: Ejemplos de aplicaciones de la biotecnología vegetal. Capítulo 4. pp.: 421-433.

**Escandón, A., Miyajima, I., Alderete, M., Hagiwara, J.C., Facciuto, G., Mata, D. y Soto, M.S.** 2005a. Wild ornamental germplasm exploration and domestication based on biotechnological approaches. *In vitro* colchicine treatment to obtain a new cultivar of *Scoparia montevidiensis*. *Electronic Journal of Biotechnology*. Vol. 8 No. 2, Issue of August 15. ISSN: 0717-3458. DOI: 10.2225/vol8-issue2-fulltext-2.

**Escandón, A. S., Pérez de la Torre, M., Acevedo, A., Marcucci-Poltri, S. y Miyajima, I.** 2005b. Anchored ISSR as molecular marker to characterize accessions of *Jacaranda mimosifolia* L. Don. *Proceedings of V<sup>th</sup> on New Flor. Crops*. ISHS. A.F.C. Tombolato y G.M. Dias-Tagliacozzo eds. *Acta Horticulturae* 683. pp. 121-127.

**Escandón, A. S., Pérez de la Torre, M., Soto, M. y Zelener, N.** 2005c. Identificación de clones selectos de *Nierembergia linariaefolia* mediante microsatélites anclados. *Revista de Investigación Agropecuaria*: 34 (1): 3-15.

**Escandón, A., Zelener, N., Pérez de la Torre, M. y Soto, S.** 2007b. Molecular identification of new varieties of *Nierembergia linariaefolia*, a native Argentinean ornamental plant. *J. Appl. Genet.* 48(2), 115-123.

**Excoffier, L. and H.E. L. Lischer.** 2010. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*. En prensa. <http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin3>.

**Facciuto, G., Coviella, A., Bologna, P., Pannunzio, M.J. y Soto, S.** 2009a. Hibridization between pink and yellow *Tabebuia* species native to Argentina (*Bignoniaceae*). Proceedings of the Sixth International Symposium on New Florucultural Crops. ISHS. Acta Horticultrae 813: 127-131.

**Facciuto, G., Coviella, A., Pannunzio, M.J. y Soto, S.** 2009b. New form of *Tabebuia* hybrid for pot plant use. XVII Congreso Brasileiro de Floricultura y Plantas Ornamentales. IV Congreso Brasileiro de Cultivos de Tejidos de Plantas. Aracaju, Brasil.

**Facciuto, G., Pannunzio, M.J., Coviella, M.A., Soto, S., Hagiwara, J.C. y Borja M.** 2006. Characterizaation of the ornamental value of *Calibrachoa spp* native to Argentina. Act Hort (ISHS) 714: 37-42.

**Facciuto, G., Soto, S. y Maldonado, S.** 2008. Domestication an breeding of ornamental plants native to Argentina: the case of *Tabebuia* and *Nierembergia* genera. En: Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology. Advances and Tropical Issues. Ed. Global Scence Books. Vol 5: 164-170.

**Fernández, M.E.; Figueras, A.M. y Benito, C.** 2002. The use of ISSR and RAPD markers for detecting DNA polymorphism, genotype identification and genetic diversity among barley cultivars with known origin. Theor. Appl. Genet. 104: 845-851.

**Fleuroselect.** [www.fleuroselect.com](http://www.fleuroselect.com) (último acceso: Diciembre 2010)

**Flora del Conosur.** Catálogo de las Plantas Vasculares. Instituto de Botánica Darwinion. <http://www2.darwin.edu.ar/Proyectos/FloraArgentina/FA.asp>. (Último acceso: Enero 2010)

**Franco, J., Crossa, J., Ribaut, J.M. y Bertran, J.** 2001. A method for combining molecular markers and phenotypic attributes for classifying plan genotypes. Theor Appl Genet. 103:944-952.

**Fries, R.E.** 1911. Die Arten der Gattung *Petunia*. Kungl. Svenska Vetenskapsakademiens Handl 45(5): 1-72.

**Galantini, E., Arbo, J.A., West, M., Carmona, M.A., Petit, M.A.** 2008. Proyecto de Ley para la creación del Fondo Nacional para la Floricultura para las provincias de Buenos Aires, Chubut, Cordoba, Corrientes, Entre Rios, Formosa, La Pampa, Mendoza, Misiones, Salta, Santa Fe y Tucumán. Número de Expediente: 5716-D-2008. Trámite Parlamentario 140.

**García-Mas, J., Graziano, E., Aranzana, M., Monforte, A., Oliver, M., Ballester, J., Viruel, M. y Arús, P.** 2000. Capítulo 3. Marcadores de ADN: Concepto, tipos, prococolos. En: Los marcadores genéticos en la mejora vegetal. Ed. Nuez, F y Carrillo, J.M. Editorial de la UPV. ISBN 84-7721-945-1. PP 91-151.

- González, A., Wong, A., Delgado-Salinas, A., Papa, R. y Gepts, P.** 2005. Assessment of Inter Simple Sequence Repeat Markers to Differentiate Sympatric Wild and Domesticated Populations of Common Bean. *Crop Sci.* 45: 606–615.
- Gostimsky, S. A., Kokaeva, Z. G. y Kononov, F.A.** 2005. Studying Plant Genome Variation Using Molecular Markers. *Russian Journal of Genetics*, Vol. 41, No. 4 pp. 378–388.
- Greppi, J., Hagiwara, J.C. y Coviella, A.** 2009. Niveles de ploidía e hibridación interespecífica en *Mecardonia*. 11º Jornadas Nacionales de Floricultura. Montecarlo, Misiones.
- Gupta, M., Chyi, I.S., Romero-Severson, J. y Owen, J.L.** 1994. Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple-sequence repeats. *Theoretical and Applied Genetics*. Volume 89, Numbers 7-8, 998-1006, DOI: 10.1007/ BF00224530.
- Gupta, P.K.; Varshney, R.K.** 2000. The development and use of microsatellite markers for genetic analysis and plant breeding with emphasis on bread wheat. *Euphytica* 113: 163-185.
- Gupta, P.K., Varshney, R.K., Sharma, P.C. y Armes, B.** 1999. Molecular markers and their applications in wheat breeding. *Plant Breeding* 118: 369-390. ISSN 0179-9541.
- Hagiwara, J.C.** 2010. Calibrachoas. *Economía y Viveros*, Mayo 2010. (Último acceso: Noviembre 2010) [http://www.economiayviveros.com.ar/mayo2010/produccion\\_cultivo\\_plantas\\_ornamentales\\_flores\\_de\\_corte\\_2.html](http://www.economiayviveros.com.ar/mayo2010/produccion_cultivo_plantas_ornamentales_flores_de_corte_2.html).
- Hess, C.** Presidente. 1987. *Agricultural Biotechnology Strategies for National Competitiveness*. Committee on a National Strategy for Biotechnology in Agriculture. Board on Agriculture National Research Council. National Academy Press. ISBN 0-309-0-3745-X.
- Hunziker, A.** 2001. *Genera Solanacearum*. The genera of Solanaceae illustrated, arranged according to a new system. A.R.G. Gantner Verlag K.-G. ISBN 3-904144-77-4.
- Imhof, L., Badariotti, E., Bettolli, F., Suarez, M., Facciuto, G., Soto, S. y Benavente, A.G.** 2009. Characterization of the ornamental value of *Glandularia* spp. native to Argentina. *Act Hort (ISHS)* 813: 293-298.
- INTeA S.A.** Innovaciones Tecnológicas Agropecuarias S.A. Agencia de Cooperación Internacional del Japón (JICA) Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Estudio sobre la Caracterización de la Producción Florícola en la República Argentina. Marzo de 2003. 87p.

**Jain, A., Apparanda, C. y Bhalla, P.** 1999. Evaluation of genetic diversity and genome fingerprinting of *Pandorea (Bignoniaceae)* by RAPD and inter-SSR PCR. *Genome* 42: 714-719.

**Jorasch, P.** 2004. Intellectual Property Rights in the Field of Molecular Marker Analysis. En: *Biotechnology in Agriculture and Forestry 55. Molecular Marker Systems in Plant Breeding and Crop Improvement. Section IV.1.* Springer-Verlag. ISSN 0934-943X. ISBN 3-540-20689-2.

**Joshi, S.P. Gupta, V.S. Aggarwal, R.K, Ranjekar, P.K. y Brar, D.S.** 2000. Genetic diversity and phylogenetic relationship as revealed by inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism in the genus *Oryza*. *Theor. Appl. Genet.* 100:1311-1320.

**Jussieu, A. L.** 1803. Sur le *Petunia*, genre nouveau de la famille des plantes solanées. *Ann. Mus. Nat.* 2:214-216.

**Kanaya, T., Watanabe, H., Kokubun, H., MatsubaraK., Hashimoto, G., Marchesi, E., Bullrich, L. y Ando, T.** 2010. Current status of commercial *Calibrachoa* cultivars as assessed by morphology and other traits. *Scientia Horticulturae* 123: 488–495.

**Klasman, R.** 2007. Floricultura en Corrientes. <http://www.buscagro.com/biblioteca/Rolando-Klasman/Floricultura-en-Corrientes.pdf>.

**Kobayashi, N., Hagiwara, J.C., Miyajima I., Facciuto, G., Soto, S., Mata, D. y Escandón, A.** 2004. A new pot plant variety bred by interspecific crossing between *Tecoma stans* (L.) H.B.K. and *T. garrocha* Hieron. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* 73(1): 69-71.

**Kojima, T., Nagaoka, T., Noda, K. y Ogihara, Y.** 1998. Genetic linkage map of ISSR and RAPD markers in Einkorn wheat in relation to that of RFLP markers. *Theor Appl Genet* 96: 37-45.

**Kosman E., Leonard K.** 2005. Similarity coefficients for molecular markers in studies of genetic relationships between individuals for haploid, diploid, and polyploid species. *Mol Ecol* 14:415–424. doi:10.1111/j.1365-294X. 2005.02416.x

**La LLave, P y Lexarza, J.J.M.** 1825. *Calibrachoa*. *Novorum Vegetabilium Descriptiones* 2: 3. 1825.

**Langridge, P. y Chalmers, K.** 2004. The Principle: Identification and Application of Molecular Markers. En: *Biotechnology in Agriculture and Forestry 55. Molecular Marker Systems in Plant Breeding and Crop Improvement. Section 1. Basics.* Springer-Verlag. ISSN 0934-943X. ISBN 3-540-20689-2.

**Laurentin, H.** 2009. Data analysis for molecular characterization of plan genetic resources. *Genet Resour Crop Evol* 56: 277-292.

- Levinson, G. y Gutman, G.A.** 1987. Slipped strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. *Mol Biol Evol* 4: 203-221.
- Leroy, X.J., Leon, K., Hily, J.M., Chaumeil, P. y Branchard, M.** 2001. Detection of in vitro culture-induced instability through inter-simple sequence repeat analysis. *Theor Appl Genet* 102: 885–891
- Manimekalai, R. y Nagarajan, P.** 2006. Assessing genetic relationships among coconut (*Cocos nucifera* L.) accessions using inter simple sequence repeat markers. *Scientia Horticulturae* 108: 49–54
- Mansyah, E., Sobir, Santosa, E. y Poerwanto, R.** 2010. Assessment of inter simple sequence repeat (ISSR) technique in mangosteen (*Garcinia mangostana* L.) grown in different Sumatra region. *Journal of Horticulture and Forestry* Vol. 2(6) pp. 127-134, ISSN 2006-9782.
- Mantel, N.A.** 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Res.* 27, 209–220.
- Mata, D., Coviella, M.A., Borja, M.M. y Facciuto, G.** 2007. New forms of *Gloxinia gymnostoma* (Gesneriaceae) produced by polyploidization. *Act Hort* 813: 393-398.
- Mata, D., Karlanian, M., Montenegro, A., Bullrich, L. y Morisigue, D.** 2003. Evaluación del crecimiento de *Jacaranda mimosifolia* como planta en maceta en diferentes sustratos y niveles de fertilización. V Jornadas Nacionales de Floricultura. San Miguel de Tucumán, Argentina.
- Maritano, P.; Alderete, L; Pérez de la Torre, M. y Escandón, A.** 2009. *In vitro* propagation and genetic stability análisis of *Evolvulus* spp. Biotechnological tools for the exploration of native germplasm with ornamental potential. *In Vitro Cellular & Developmental Biology- Plant*.
- Meerow, A.W.** 2005. Molecular genetic characterization of new floricultural germplasm. *ISHS Acta Horticulturae* 683: V International Symposium on New Floricultural Crops.
- Miller, Mark P.** 1997. Tools for population genetic analysis (TFPGA) 1.3: A windows program for the analysis of alloenzyme and molecular population genetic data. Computer software distributed by author.
- Mohammadi, S. y Prasanna, B.** 2003. Analysis of Genetic Diversity in Crop Plants—Salient Statistical Tools and Considerations. *Crop Sci.* 43:1235–1248
- Moore, B.** 1920. Review: The Relative Length of Day and Night. Reviewed work: Effect of Relative Length of Day and Night and other Factors of the Environment and Reproduction in Plants by W. W.

Garner ; H. A. Allard. Source: Ecology, Vol. 1, No. 3 (Jul., 1920), pp. 234-237 Published by: Ecological Society of America.

**Moreno, S., J.P. Martín y J.M. Ortiz,** 1998. Inter-simple sequence repeats PCR for characterization of closely related grapevine germplasm. *Euphytica* 101: 117–125.

**Muthusamy, S., Kanagarajan, S. y Ponnusamy, S.** 2008. Efficiency of RAPD and ISSR markers system in accessing genetic variation of rice bean (*Vigna umbellata*) landraces. *Electronic Journal of Biotechnology* Vol. 11 No. 3, Issue of July 15, 2008. ISSN: 0717-3458. DOI: 10.2225/vol11-issue3-fulltext-8

**Nei, M.** 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc Nat Acad Sci USA* 70:3321–3323. doi: 10.1073/pnas.70.12.3321.

**Nei, M.** 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a Small number of individuals. *Genetics* 89: 583-590.

**Nuez, F., Carrillo, J., de Ron, A.** 2000. Capítulo 1. Introducción. En: Los marcadores genéticos en la mejora vegetal. Ed. Nuez, F y Carrillo, J.M. Editorial de la UPV. ISBN 84-7721-945-1. PP 3-22.

**Ortiz, J.M., Aguinagalde, I. y Martín, J.P.** 2000. Capítulo 11. Identificación varietal. En: Los marcadores genéticos en la mejora vegetal. Ed. Nuez, F y Carrillo, J.M. Editorial de la UPV. ISBN 84-7721-945-1. PP 515-579.

**Ott J.** 1992. Strategies for characterizing highly polymorphic markers in human gene mapping. *Am J Hum Genet* 51:283–290.

**PanAmerican Seed.** <http://www.panamerican.com> (último acceso: Diciembre 2010)

**Pannunzio, M.J., Soto, M.S., Coviella, M.A., Bologna, P., Alvarez, S. y Facciuto, G.** 2006. Obtención de híbridos enterospecíficos en el género *Passiflora*. 3º Congreso Argentino de Floricultura, 8vas Jornadas Nacionales de Floricultura. La Plata, Buenos Aires.

**Parodi, D.** 2009. Avances de la floricultura Argentina. *Horticom news*. <http://www.horticm.com/pd/article.php?sid=72939> (último acceso: diciembre 2010)

**Peakall, R. y Smouse P.** 2006. GenAEx 6: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6, 288-295. Versión: 6.3, 2009. <http://www.anu.edu.au/BoZo/GenAEx/>

**Peng Nan, Suhua Shi, Shaolin Peng, Chunjie Tian y Yang Zhong.** 2003. Genetic Diversity in *Primula obconica* (Primulaceae) from Central and South-west China as Revealed by ISSR Markers. *Annals of Botany* 91: 329-333. Doi: 10.1093/aob/mcd018.

**Pérez de la Torre, M., Acevedo, A., Serpa, J.C., Miyajima, I. y Escandón, A.S.** 2003. Puesta a punto de la técnica de microsatélites anclados para la caracterización de individuos selectos de Jacarandá. En: *Floricultura en la Argentina. Investigación y Tecnología de producción.* Mascarini, L. Vilella, F. y Wright, E, eds. pp: 3-12.

**Pérez de la Torre, M., Escandón, A.** 2006. Construction of a molecular identification profile of new varieties of *Nierembergia linariaefolia* by anchored microsatellites. *Electronic Journal of Biotechnology*. EJB, Vol.9 No.3, Special Issue, 2006. ISSN: 0717-3458. DOI: 10.2225/vol9-issue3-17.

**Pérez de la Torre, M., Zirilli, P., Ulrich, N., Setten, L. y Escandón, A.** 2010. Caracterización molecular en el género *Mecardonia* Ruiz y Pav. (Plantaginaceae) utilizando marcadores ISSR. *Revista de la Facultad de Agronomía de La Plata.* (En prensa).

**Powell, W., Morgante, R., Andre, C., Hanafey, M., Vogel, J., Tingey, S., Rafalsky, A.** 1996. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. - *Mol. Breed.* 2: 225-238.

**Pradeep Reddy, M.; Sarla, N. and Siddiq E.A.** 2002. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica.* 128: 9-17.

**Prevost, A. y Wilkinson, M.J.** 1999. A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars. *Theoretical Applied Genetics:* 98: 107-112.

**Proven Winners.** 2010. (último acceso, Noviembre 2010. <http://www.provenwinners.com/plants/?doSearch=1&searchSeries=Superbells>)

**Rakoczy-Trojanowska M, Bolibok H.** 2004. Characteristics and comparison of three classes of microsatellite-based markers and their application in plants. *Cell. Mol. Biol. Lett.* 9: 221–238.

**Ratnaparkhe, M.; Tekeoglu, M. y Muehlbauer, F.** 1998. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism are useful for finding markers associated with disease resistance gene clusters. *Theor Appl Genet* 97:515-519.

**Reddy, S., Babu, P., Swamy, M., Kaladhar, K. Y Sarla, N.** 2009. ISSR markers based on GA and AG repeats reveal genetic relationship among rice varieties tolerant to drought, flood, or salinity. *J Zhejiang Univ Sci B* 10(2): 133-141. ISSN 1673-1581 (Print); ISSN 1862-1783 (Online).

**Reif, J.C., Melchinger, A.E. y Frisch, M.** 2005. Genetical and Mathematical Properties of Similarity and Dissimilarity Coefficients Applied in Plant Breeding and Seed Bank Management. *Crop Sci.* 45: 1–7.

**Rohlf, F.J.** 1998. NTSYS-pc Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, Version 2.02. Exeter Publishing Ltd., Setauket, New York, USA.

**Ruan, C., Li, H y Mopper, S.** 2009. Characterization and identification of ISSR markers associated with resistance to dried-shrink disease in sea buckthorn. *Mol Breeding* 24:255–268. DOI 10.1007/s11032-009-9288-5.

**Sakata Seed Corporation.** www.sakata.com (último acceso: Diciembre 2010)

**Salhi-Hannachi, A., Khaled, C., Messaoud, M., Mohamed, M. y Mokhtar, T.** 2005. Comparative analysis of genetic diversity in two Tunisian collections of fig cultivars based on random amplified polymorphic DNA and inter simple sequence repeats fingerprints. *Genetic Resources and Crop Evolution* 52: 563–573. DOI 10.1007/s10722-003-6096-3

**Salvi, L.; Pérez de la Torre, M.; Rodríguez, M. y Escandón, A.** 2009. Ajuste de ISSRs para el análisis de la variabilidad genética en el género *Glandularia*. VII Simposio REDBIO Argentina 2009 y II Congreso Internacional REDBIO Argentina. ISBN 978-950-673-729-0:148. Sección: ómicas.

**Sankar, A. y Moore, G.** 2001. Evaluation of inter-simple sequence repeat analysis for mapping in Citrus and extension of the genetic linkage map. *Theor Appl Genet* 102:206–214

**Sica, M., Gamba, G., Montieri, S., Gaudio, L. y Aceto, S.** 2005. ISSR markers show differentiation among Italian populations of *Asparagus acutifolius* L. *BMC Genetics*, 6:17 doi: 10.1186/1471-2156-6-17.

**Sneath, P.H.A. y Sokal, R.R.** 1973. Numerical taxonomy. Freeman, San Francisco, CA.

**Smith, J.S.C., Chin, E.C.L., Shu, O.S., Wall, S.J., Senior, M.L., Mitchel, S.E., Kresovich, S. y Ziegler, J.** 1997. An evaluation of SSR loci as molecular markers in maize (*Zea mays* L.): comparison with data from AFLPs and pedigree. *Theor. Appl. Genet.* 95: 163–173.

**Sokal, R. y J. Rohlf.** 1994. Biometry: The Principles and Practice of Statistics in Biological Research (3rd edn). Freeman & Co, NY.



- Soto, S., Bullrich, L., Facciuto, G., Hagiwara, J.C., Mata, D., Serpa, J.C., Kobayashi, N., Morisigue, D. y Miyajima I.** 2005. New clone of *Nierembergia linariaefolia* bred from population native to Argentina. Act Hort. (ISHS) 683: 407-410.
- Soto, S., Bullrich, L., Pannunzio, M.J., Bologna, P. y Facciuto, G.** 2009. Interspecific hybridization in *Nierembergia*: a source of variation. Act Hort (ISHS) 813: 407-412.
- Soto, S., Facciuto, G., Coviella, M.A., Pannunzio, M.J. y Bologna, P.** 2006. Estudios preliminares sobre hibridación interespecífica en el género *Jacaranda*. 3º Congreso Argentino de Floricultura, 8vas. Jornadas Nacionales de Floricultura. La Plata. Buenos Aires.
- Spooner D., van Treuren R. y de Vicente M.C.** 2005. Molecular markers for genebank management. IPGRI Technical Bulletin No. 10. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy.
- Stehmann, J.R.** 1999. Estudos taxonômicos na tribo Nicotianeae (Solanaceae): revisão de *Petunia* Jussieu, das espécies brasileiras de *Calibrachoa* La Llave y Lexarza e o estabelecimento do novo gênero *Petuniopsis* Stehmann y Semir. Tese de doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- Stehmann, J.R. y Greppi J.A.** Two new species of *Calibrachoa* (Solanaceae) from subtropical South America. Novon (En prensa).
- Stehmann, J. y Semir, J.** 1997. A New Species and New Combinations in *Calibrachoa* (Solanaceae). Novon 7: 417-419.
- Suntory Flowers, Ltd.** www.surfinia.com (último acceso: Diciembre 2010)
- Sudupak, M.E.** 2004. Inter and intra-species Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) variations in the genus *Cicer*. Euphytica 135:229-238.
- Tanaka, Y., Katsumoto, Y., Brugliera, F. y Manson J.** 2005. Review of Plant Biotechnology and Applied Genetics. Genetic engineering in floriculture. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 80: 1–24.
- The Plant List.** 2010. <http://www.theplantlist.org/browse/A/Solanaceae/Calibrachoa/> (último acceso: Diciembre 2010)
- Thimmapaiah; Santhosh, W.; Shobha, D. and Melwyn, G.** 2009. Assessment of genetic diversity in cashew germplasm using RAPD and ISSR markers. Scientia Horticulturae 120:411-417.

**Tsukamoto, T.; Ando, T.; Watanabe, H.; Kokubun, H.; Hashimoto, G.; Sakazaki, U.; Suárez, E.; Marchesi, E.; Oyama, K. y Kao, T.** 2002. Differentiation in the status of self-incompatibility among *Calibrachoa* species (Solanaceae). J. Plant. Res. 115: 185-193.

**Ulrich M. N.; Pérez de la Torre M. C.; y Escandón A. S.** 2009. Caracterización molecular de Bignoniáceas con potencial ornamental. VII Simposio REDBIO Argentina 2009 y II Congreso Internacional REDBIO Argentina. Rosario, Santa Fé.

**Universidad de la Columbia Británica, Canada (UBC)** [http://www.michaelsmith.ubc.ca/services/NAPS/Primer\\_Sets/](http://www.michaelsmith.ubc.ca/services/NAPS/Primer_Sets/) (último acceso: junio 2009)

**UPOV.** [http://www.upov.int/index\\_es.html](http://www.upov.int/index_es.html) (último acceso: noviembre 2010)

**Vaccaro, M. S.; Pérez de la Torre, M. C. y Escandón, A. S.** 2008. Ensayos preliminares para el establecimiento de un protocolo de micropropagación *in vitro* de *Glandularia peruviana* (L.) Small. y evaluación de la estabilidad genética. 4º Congreso Argentino de Floricultura y Plantas Ornamentales. 10ª Jornadas Nacionales de Floricultura. pp: 502-507.

**Van der Nest, M.A., Steenkamp, E.T., Wigfield, B.D. and Wingfield, M.J.** 2000 Development of simple sequence repeat (SSR) markers in *Eucalyptus* from amplified inter-simple sequence repeats (ISSR). Plant Breed. 119: 433-436.

**Wang, K., Kang, J., Zhou, H., Sun, Y., Yang, Q., Dong, J. y Meng, L.** 2009. Genetic diversity of *Iris lactea* var. *chinensis* germplasm detected by inter-simple sequence repeat (ISSR). African Journal of Biotechnology Vol. 8 (19), pp. 4856-4863. ISSN 1684-5315.

**Weising, K., Atkinson, R.G. y Gardner, R.C.** 1995. Genomic fingerprinting by microsatellite-primed PCR: a critical evaluation. PCR Methods Appl. 4: 249-255.

**Weising, K., Nybon, H., Wolff, K. y Kahl, G.** 2005. Applications of DNA Fingerprinting in Plant Sciences. In DNA Fingerprinting in Plants. Principles, Methods and Applications (2<sup>nd</sup> edition). Taylor and Francis, Eds. CRC Press Boca Raton, London, New York, Singapore. 444 pp.

**Wijsman, H.** 1990. On the inter-relationships of certain species of *Petunia* VI. New names for the species of *Calibrachoa* formerly included into *Petunia* (Solanaceae). Acta Bot. Neerl. 39: 101-102.

**Wijsman, H. y de Jong, J.** 1985. On the inter-relationships of certain species of *Petunia* IV. Hybridization between *P. linearis* and *P. calycyna* and nomenclatorial consequences in the *Petunia* group. Acta Bot. Neerl. 34: 337-349.

- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A., y Tingey, S.V.** 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acid Res.* 18: 6231-6235.
- Wolfe, A.D., Xiang, Q.-Y and Kephart, S.R.** 1998. Assessing hybridization in natural populations of *Penstemon* (*Scrophulariaceae*) using hypervariable inter simple sequence repeat markers. *Mol. Ecol.* 71: 1107-1125.
- Wolff, K.; Zietekewicz, E. y Hofstra, H.** 1995. Identification of *chrysantemun* cultivars and stability of DNA fingerprinting patterns. *Theor. Appl. Genet.* 91: 439-447.
- Xue-Jun Ge, Yan Yu, Yong-Ming Yuan, Hong-Wen Huang y Cheng Yan.** 2005. Genetic Diversity and Geographic Differentiation in Endangered *Ammopiptanthus* (*Leguminosae*) Populations in Desert Regions of Northwest China as Revealed by ISSR Analysis. *Annals of Botany* 95: 843–851. doi:10.1093/aob/mci089
- Yang, W., Glover, B., Rao, G. y Yang, J.** 2006. Molecular evidence for multiple polyploidization and lineage recombination in the *Chrysanthemum indicum* polyploid complex (*Asteraceae*). *New Phytologist* 171: 875–886. doi: 10.1111/j.1469-8137.2006.01779.x
- Zietkiewicz, E., Rafalski, A. y Labuda, D.** 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymorphism chain reaction amplification. *Genomics*: 20: 176-183.
- Zuloaga, F., Morrone, O. y Belgrano, M. (eds.).** 2007. Novedades taxonómicas y nomenclaturales para la flora vascular del Cono Sur de Sudamérica. *Darwiniana* 45(2): 236-241. ISSN 0011-6793.