

Caracterización molecular en el género *Mecardonia* Ruiz & Pav. (*Plantaginaceae*) utilizando marcadores ISSR

Mariana Pérez de la Torre^{1,4}, Patricia Zirilli¹, Noelia Ulrich¹, Lorena Setten^{2,3} y Alejandro Escandón^{1,3}

¹ Instituto de Floricultura – CNIA – INTA. De los Reseros y Nicolás Repetto s/n. (1686) Hurlingham, Buenos Aires, Argentina. Tel/fax: 54 11 4481 3736 / 3497, ² Instituto de Ciencia y Tecnología Dr. César Milstein, Saladillo 2468 (1440), Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina. ³ Dirección actual: Instituto de Genética "Ewald A. Favret" – CNIA – INTA. De los Reseros y Nicolás Repetto s/n. (1686) Hurlingham. Buenos Aires. Argentina. ⁴ mpdelatorre@cnia.inta.gov.ar

Pérez de la Torre, Mariana, Patricia Zirilli, Noelia Ulrich, Lorena Setten, Alejandro Escandón (2010) Caracterización molecular en el género *Mecardonia* Ruiz & Pav. (*Plantaginaceae*) utilizando marcadores ISSR. Rev.Fac.Agron. Vol 109 (1): 23- 29

En el marco del programa de desarrollo de germoplasma ornamental nativo del INTA se incluyó el estudio del género *Mecardonia*. El género en cuestión se caracteriza por su forma compacta, la variabilidad en el tamaño y color de sus flores, su largo período de floración y su fácil propagación. Con la finalidad de estimar la diversidad genética presente en veinticinco individuos pertenecientes a dos especies del género *Mecardonia*, se emplearon siete microsatélites anclados, los cuales generaron un total de 557 *loci* polimórficos, con un promedio de 80 *loci* por iniciador. Los valores de Rp variaron entre 11,923 y 25,231; el promedio del PIC fue de 0,130 y el MI varió de 5,875 a 12,160. A partir de la matriz de similitud genética entre individuos, obtenida mediante la aplicación del coeficiente de Dice y el análisis de agrupamiento (UPGMA) se construyó un fenograma que permitió separar a los 25 individuos en 3 grupos bien definidos, uno de los cuales incluye a los individuos de *M. procumbens* var. *tenella*, otro agrupa a los individuos de *M. procumbens* var. *flagellaris*, mientras que el último incluye a los individuos de *Mecardonia* sp junto a individuos de *M. procumbens* var. *Flagellaris*. Se calculó un valor de coeficiente de correlación copenética de $r=0,99$ entre la matriz de similitud y el fenograma generado. Los resultados obtenidos en este trabajo permitieron diferenciar inequívocamente la totalidad de los individuos analizados, pudiéndose inferir un alto grado de variabilidad en la población bajo estudio. Los ISSRs constituyen una herramienta molecular eficaz cuando se requiera una manipulación simple, confiable y de bajo costo.

PALABRAS CLAVE: ISSR, variabilidad genética, germoplasma ornamental nativo.

Pérez de la Torre, Mariana, Patricia Zirilli, Noelia Ulrich, Lorena Setten, Alejandro Escandón (2010) Molecular characterization of *Mecardonia* genus using ISSR markers. Rev.Fac.Agron. Vol 109 (1): 23- 29

Twenty five individuals of *Mecardonia* Ruiz & Pav. genus (*Plantaginaceae*, ex-*Scrophulariaceae*) were selected for their ornamental traits into the context of the native ornamental germplasm breeding program of INTA. Seven Inter-Simple Sequences Repeats primers (ISSRs) were used for fingerprinting diagnosis. The molecular marker used revealed high levels of polymorphism, and they generated 557 *loci*. The average number of *loci* per primer was 80; Rp values ranged from 11.923 to 25.231, the average of PIC value was 0.130, whereas MI values varied from 5.875 to 12.160. Similarity matrix was constructed with Dice coefficient, following UPGMA cluster analysis. ISSR showed an "r" value of 0.99 for similarity and copenetics matrixes comparison. These results allowed the genetic discrimination between the accessions analyzed, inferring a high variability degree. In the same way, the obtained results suggested that ISSRs are a good choice for molecular analysis in *Mecardonia* when simple, reliable and low cost manipulation is required.

KEY WORDS: ISSR, DNA-fingerprinting, Genetic variability, Ornamental native germplasm

Recibido: 17/07/2009

Aceptado: 25/10/2010

ISSN 0041-8676, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, UNLP, Argentina

INTRODUCCIÓN

Mecardonia Ruiz & Pav., es un género americano perteneciente a la familia Plantaginaceae, el cual está compuesto por siete especies, siendo cuatro de ellas nativas de Argentina. Las mismas se encuentran distribuidas principalmente en la región noreste del país (Rossow 1987; Souza 1997). Las características ornamentales de las especies de *Mecardonia* incluyen la forma compacta, así como también, la diversidad en el tamaño y color de sus flores (diferentes tonalidades de amarillo, blanco, lila y beige), un largo período de floración y una relativamente fácil propagación por esquejes.

Tanto el conocimiento de la diversidad, así como de las relaciones genéticas entre individuos, permiten complementar las estrategias empleadas en los programas de mejoramiento y conservación. 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).

Los marcadores moleculares en base a ADN fueron rápidamente utilizados por genetistas y mejoradores vegetales como herramientas para la caracterización y diferenciación entre genotipos. Su neutralidad, debido a que no se encuentran influenciados ni por las condiciones fisiológicas como ambientales, es su principal ventaja sobre los marcadores morfológicos (Gupta et al., 1999; Nuez et al., 2000; Azófeifa-Delgado, 2006), así como su poder de resolución, la celeridad en la obtención de la información y la determinación de los criterios de distinguibilidad, homogeneidad y estabilidad establecidos por las directrices de la UPOV para las nuevas variedades, son algunas de las ventajas que ofrecen estas herramientas (Weising et al., 2005). Algunos marcadores (AFLP) cubren amplias regiones del genoma permitiendo la generación de una gran cantidad de datos factibles de ser analizados mediante programas bioinformáticos (Zelener et al., 2005).

Los microsatélites son secuencias cortas de ADN constituidas por motivos de 1 a 6 nucleótidos repetidos en tándem. Esta clase de secuencias simples de ADN se encuentran en forma abundante y uniforme en los genomas de la mayoría de los organismos eucariotas (García-Mas et al., 2000), como procariontas (Rakoczy-Trojanowska & Bolibok, 2004). La técnica de ISSRs (Inter Simple Sequence Repeat) (microsatélites anclados) consiste en la amplificación de segmentos de ADN, cuya longitud puede variar entre 100 pb y 3000 pb, presentes entre dos regiones idénticas de microsatélites orientadas en sentido opuesto. Los iniciadores para esta técnica son diseñados a partir de las secuencias de microsatélites, a las que se les incorpora un número variable de nucleótidos, generalmente de 2 a 5, sólo en uno de los extremos 5' ó 3', y cuya función es minimizar la hibridación inespecífica del iniciador en diferentes sitios dentro del microsatélite, incrementando la reproducibilidad del método (Zietkiewicz et al., 1994).

Entre los métodos que generan marcadores dominantes de ADN *multiloci* (Spooner et al., 2005, Weising et al., 2005), los ISSRs han revelado un alto

grado de polimorfismo (Zietkiewicz et al., 1994) generando información confiable para el análisis de ADN, debido a la reproducibilidad del método (Nuez et al., 2000; Nybom 2004). Además, la técnica se caracteriza por una gran simplicidad y economía de manejo y por poseer la sensibilidad necesaria para distinguir entre individuos genéticamente muy próximos (Hundsdoerfer & Wink, 2005; Sudupak, 2004; Pérez de la Torre et al., 2003). Esta técnica fue aplicada satisfactoriamente en la identificación de cultivares de diferentes especies: papa (*Solanum tuberosum* L.) (Prevost & Wilkinson 1999); arroz (*Oryza sativa* L.) (Bao et al., 2006) y en especies del género *Vigna umbellata* (Thumb.) Ohwi & H. Ohashi (Muthusamy et al., 2008), como así también en especies ornamentales, i.e. crisantemo (*Chrysanthemum indicum* L.) (Yang et al., 2006), *Jacaranda* Juss. (Escandón et al., 2005b y Pérez de la Torre et al., 2003) y *Nierembergia linariaefolia* Graham (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 et al., 2005; Xue-Jun Ge et al., 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., 2010) y *Glandularia* (Vaccaro et al., 2008).

El presente trabajo se encuentra en el contexto de un programa de mejoramiento, aplicando herramientas clásicas y biotecnológicas, que incluyen a *Mecardonia* (Alderete et al., 2006 y Escandón et al., 2007a) y a otros géneros de la familia Plantaginaceae como *Scoparia* L. (Escandón et al., 2005a) y *Bacopa* Aubl. (Escandón et al., 2006). Los genotipos de *Mecardonia* incluidos en este estudio fueron seleccionados en base a sus características ornamentales, tales como tamaño de la planta, color y forma de las flores.

En el presente trabajo se obtuvieron los perfiles moleculares con la finalidad de complementar la información requerida sobre descriptores clásicos en el género y se estimó, además, la diversidad genética entre 25 individuos pertenecientes a las especies *M. procumbens* var. *tenella* (Cham. & Schldl.), *M. procumbens* var. *flagellaris* (Cham. & Schldl.) y de tres individuos del género que todavía no pudieron ser clasificados, que fueron denominados como *Mecardonia* sp. Este estudio constituye el primer reporte de una descripción del género *Mecardonia* mediante marcadores moleculares.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se estudió un total de veinticinco individuos del género *Mecardonia* identificados como Mec1 a Mec25 de acuerdo a la siguiente distribución: Mec1 a Mec3: *Mecardonia* sp; Mec4 a Mec8 y Mec20 a Mec25: *M. procumbens* var. *flagellaris* (Cham. & Schldl.); Mec9 a Mec19: *M. procumbens* var. *tenella* (Cham. & Schldl.). Como control de la técnica se utilizó un individuo de *Calibrachoa linearis* (Hook.) Wijsman (*Solanaceae*) (Cal).

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

Extracción y cuantificación de ADN

La extracción de ADN total se realizó a partir de 30 mg de hojas jóvenes liofilizadas siguiendo el método del CTAB: "Small-Scale Extraction of High Quality DNA" según los protocolos de CIMMYT (2005), con las siguientes modificaciones: tiempo de incubación a 65°C durante 120 minutos, velocidad de centrifugación 13.000 RPM a una temperatura de 4°C. Se realizó la precipitación con medio volumen de isopropanol frío. El precipitado se resuspendió en 250 µL de TE 1X, el cual fue tratado con una solución de RNasa (1%). El ADN así obtenido fue purificado mediante extracción con solventes orgánicos (fenol:cloroformo:alcohol isoamílico 25:24:1); posteriormente y luego de una doble extracción acuosa, el sobrenadante fue tratado con cloroformo:octanol (24:1). La precipitación final se realizó con un 5% de NaCl y medio volumen de isopropanol frío. El precipitado se lavó 2 veces con etanol 70%. La calidad y cantidad de ADN obtenido se determinó por comparación con el marcador de peso molecular λ cortado con la enzima *Hind* III (Pb-L, UNQ) sobre un gel de agarosa (TAE 1X) al 0,8% teñido con bromuro de etidio (0,01 mg/mL).

Generación de ISSRs

Se utilizaron 7 iniciadores ISSR (Tabla 1), descriptos por la UBC (Universidad de la Columbia Británica, Canadá) (Jain et al., 1999, Blair et al., 1999 y Pérez de la Torre et al., 2003). Las reacciones de PCR (Polymerase Chain Reaction) se llevaron a cabo en un volumen final de 25 µl, conteniendo 30 ng de ADN; 0,5 U de Taq polimerasa; 2,5 µl de buffer de reacción 10X; 2,0 mM de MgCl₂ (Kit Inbio Highway); 0,2 mM de cada dNTP (Inbio Highway) y 0,8 µM de iniciador (Qiagen Operon). La amplificación de fragmentos se llevó a cabo en un termociclador Bio Rad, bajo las siguientes condiciones: desnaturalización preliminar, 10 minutos a 94°C, seguida de 40 ciclos a 94°C durante 40 segundos, temperatura de hibridación según iniciador

(Tabla 1) durante 45 segundos, 72°C durante 90 segundos y extensión final de 10 minutos a 72°C. Los productos de PCR se sembraron en un gel de agarosa al 2,5% (TAE 1X), teñidos con bromuro de etidio (0,05 mg/mL), documentado con el sistema de fotografía DocIt® de UVP. Los fragmentos de ADN amplificados fueron estimados (en pares de bases –pb-) por comparación con marcadores de peso molecular (100 bp y 50 bp ladder, PB-L, UNQ).

Para evaluar la reproducibilidad del perfil de bandas obtenido se llevaron a cabo tres repeticiones tanto de la extracción de ADN como de las reacciones de PCR, considerando para el análisis sólo aquellas bandas claramente definidas. Las bandas con igual migración fueron consideradas como fragmentos idénticos, independientemente de su intensidad. El análisis de los perfiles de amplificación se realizó visualmente con ayuda del soporte bioinformático "Gel-Pro Analyzer" versión 3.1 (Media Cybernetics).

Análisis de datos

Cada fragmento amplificado se consideró como un alelo dominante para cada *locus*, clasificando 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 usó para calcular el coeficiente de similitud de Dice (1945) ($S_{ij} = 2a/(2a+b+c)$, 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* y *c* es el número de bandas presentes en *j* y ausentes en *i*, entre todos los posibles pares de entradas. Con los coeficientes de similitud estimados, se construyó el fenograma mediante el método UPGMA (Unweighted Pair Group with Arithmetic Averages). Los análisis se llevaron a cabo con el programa NTSYS-pc vs. 2.02 (Rohlf, 1998) y se aplicó el test de Mantel (1967) a fin de determinar el coeficiente de correlación cofenética (*r*) para verificar el grado de ajuste entre los datos obtenidos en la matriz de similitud y el fenograma generado.

Tabla 1: Resumen de los datos obtenidos con los 7 iniciadores utilizados. T°: temperatura de hibridación, TL: loci totales, P%: porcentaje de polimorfismo, Rp: Resolving power, PIC: contenido de información polimórfica, MI: marker index.

Table 1: Summary of the data obtained with the 7 used primers. T°: annealing temperature, TL: total loci, P%: percentage of polymorphism, Rp: Resolving power, PIC: polymorphic information content, MI: marker index.

Iniciador	Secuencia (5'-3')	T°	TL	P%	Rp	PIC	MI	Referencias
5'CT	CCGGATCC(CT) ₉	62	76	100	25,231	0,160	12,160	P. de la Torre et al., 2003
3'GA	(GA) ₉ T	52	84	100	21,769	0,121	10,164	Blair et al., 1999
5'CA	CCCGGATCC(CA) ₉	62	86	100	23,462	0,126	10,836	Blair et al., 1999
3'AC	(AC) ₈ G	52	81	100	22,000	0,131	10,614	UBC
5'GA	CCCGGATCC(GA) ₉	62	104	100	25,231	0,113	11,752	Blair et al., 1999
3'AG	(AG) ₈ C	52	79	100	22,385	0,135	10,665	UBC
3'TG	(TG) ₈ A	52	47	100	11,923	0,125	5,875	UBC
TOTAL			557	100	21,714	0,130	10,295	

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), contenido de información polimórfica (PIC) (Powell et al., 1996; Smith et al., 1997), "marker index" (MI) y el Resolving Power (Rp) (Prevost & Wilkinson, 1999). El PIC de cada iniciador se estimó según la fórmula: $PIC = 1 \sum p_i^2$, donde "pi" es la frecuencia del alelo i^{th} . El MI se calculó como: $MI = PIC \times n^\circ$ de bandas polimórficas. El Rp es definido por iniciador como: $Rp = \sum lb$, donde "lb" es la información de cada banda, la cual toma los valores de: $1 - (2 \times [0.5 - p])$, siendo p la proporción de cada individuo que contiene la banda.

RESULTADOS

La Figura 1 muestra, a modo de ejemplo, los perfiles de bandas obtenidos de los individuos de *Mecardonia* con el iniciador 3'AC (Figura 1a, Mec1 a Mec8) y con el iniciador 5'CA (Figura 1b, Mec9 a Mec25).

La Tabla 1 describe los iniciadores usados y resume los datos obtenidos a partir de ellos: número de *loci* totales (LT), porcentaje de polimorfismo (%P), el Rp, el PIC y el MI. Los 7 iniciadores utilizados revelaron un total de 557 *loci* polimórficos, con un promedio de 80 *loci* por iniciador. El mayor valor de Rp (25,231) fue para los iniciadores 5'CT y 5'GA, mientras que 3'TG fue el iniciador menos informativo del conjunto utilizado, con un valor de Rp de 11,923 (Tabla 1). El PIC varió entre valores de 0,113 (5'GA) a 0,160 (5'CT), con un promedio de 0,130; mientras que para el MI se determinaron valores que oscilaron entre 5,875 para el iniciador 3'TG y 12,160 para 5'CT, con un promedio de 10,295 para los 7 iniciadores utilizados, entre los cuales, en este contexto, 5'CT, 5'GA y 5'CA fueron los más informativos.

El fenograma obtenido mediante el coeficiente de Dice y el método de agrupamiento UPGMA, se muestra en la Figura 2. Se observó una alta correlación ($r=0,99$) entre la matriz de similitud y la matriz derivada del fenograma.

Los 25 genotipos se separaron en 3 grupos bien definidos, uno de los cuales incluye a los individuos de *M. procumbens* var. *tenella*, otro agrupa a los individuos de *M. procumbens* var. *flagellaris*, mientras que el último incluye a los individuos de *Mecardonia* sp junto a individuos de *M. procumbens* var. *flagellaris*. Por su parte, en el control utilizado como fuera de tipo (*C. linearis*) manifiesta bajo índice de similitud, separándose claramente de los grupos correspondientes al género *Mecardonia*

DISCUSIÓN

La caracterización e identificación genética del germoplasma, mediante marcadores moleculares, constituyen un área de aplicación de creciente importancia dentro de la producción vegetal. En particular el empleo de técnicas moleculares adquiere relevancia en los cultivos ornamentales, ya que la

mayoría de éstos carecen de estudios genómicos sobre la base de dichas herramientas (Escandón et al., 2010).

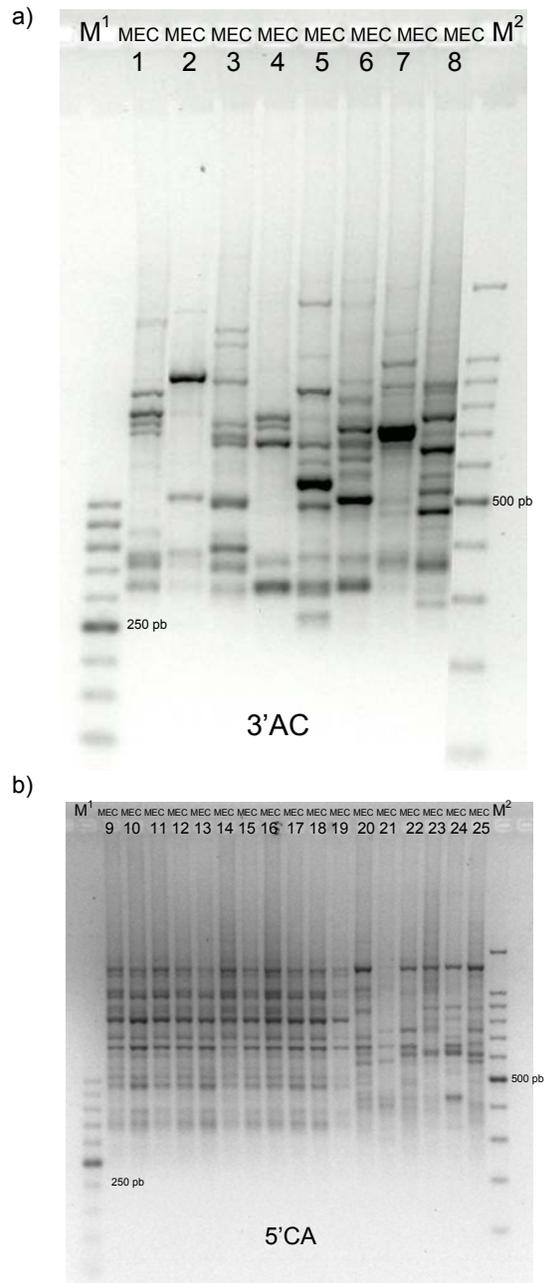


Figura 1: Perfil de bandas obtenido con los iniciadores 3'AC (a) y 5'CA (b). M¹: 50 pb, M²: 100 pb. Mec1 a Mec3: *Mecardonia* sp; Mec4 a Mec8 y Mec20 a Mec25: *M. procumbens* var. *flagellaris* (Cham. & Schltld.); Mec9 a Mec19: *M. procumbens* var. *tenella* (Cham. & Schltld.)

Figure 1: Band profile obtained with 3'AC (a) and 5'CA (b) primers. M¹: 50 bp ladder, M²: 100 bp ladder. Mec1 to Mec3: *Mecardonia* sp; Mec4 to Mec8 and Mec20 to Mec25: *M. procumbens* var. *flagellaris* (Cham. & Schltld.); Mec9 to Mec19: *M. procumbens* var. *tenella* (Cham. & Schltld.)

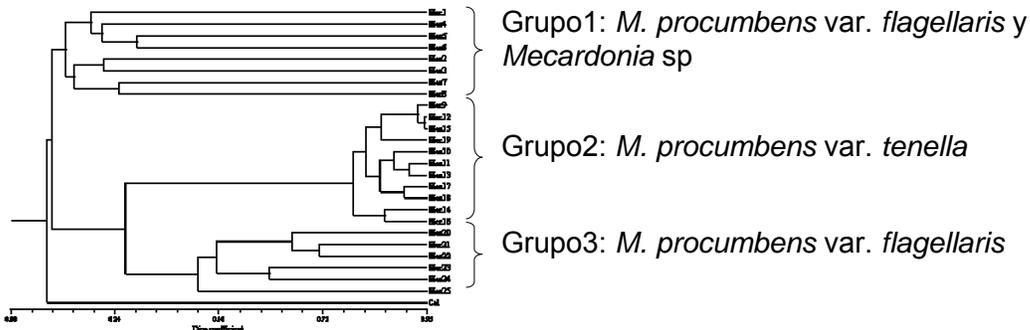


Figura 2: Fenograma ISSR basado en el método UPGMA con el coeficiente de distancia de DICE, mostrando las relaciones genéticas entre los 25 individuos de *Mecardonia*.

Figure 2: ISSR based UPGMA phenogram of DICE's genetic distance showing genetic similarity among 25 *Mecardonia* accessions.

En lo que respecta a la técnica de ISSRs, si bien se trata de marcadores denominados universales o de muy amplio rango de aplicación (Blair et al., 1999; Rakoczy-Trojanowska y Bolibok, 2004; Weising et al., 2005), en el presente trabajo, con tres de los iniciadores utilizados por Escandón et al. (2005c) -5'CA, 3'AG y 3'GA- y siete de Escandón et al. (2007b) -5'CT, 3'GA, 5'GA 5'CA, 3'AC, 3'AG y 3'TG, fue posible la caracterización molecular de los veinticinco individuos de *Mecardonia*, así como su agrupamiento por especies, discriminando *M. procumbens* var. *flagellaris* de *M. procumbens* var. *tenella*. Asimismo, algunos de los iniciadores aquí analizados se utilizaron con éxito en otros géneros, en el caso de *Oryza* L., Blair et al. (1999) utilizó los iniciadores 3'GA, 5'GA y 5'CA (entre otros), comunes a este trabajo, con el fin de determinar el nivel de polimorfismo existente en el genoma de arroz, tomando al %P como parámetro de comparación, en arroz el mismo fue de: 94,5% para 3'GA; 90,9% para 5'GA y 81,8% para 5'CA, si bien muy altos, se muestran entre un 5% y 20% menores en relación a los obtenidos para *Mecardonia* (100%).

En el presente trabajo, al igual que en Manimekalai & Nagarajan (2006), se utilizaron los iniciadores 3'AG (UBC 808) y 3'AC (UBC 827). Estos autores, evaluaron mediante ISSRs, las relaciones genéticas en 33 entradas de coco (*Cocos nucifera* L.). El iniciador 3'AG resultó menos polimórfico (80%) en *C. nucifera* versus el 100% obtenido en *Mecardonia*. También se observan diferencias con relación al MI, el mismo fue de 3,147 para coco y de 10,665 en nuestro caso. Dichos valores resultaron de los más altos en ambos estudios. Para el iniciador 3'AC, los porcentajes de polimorfismo fueron los mismos (100%), y en contraposición con nuestro estudio, donde el MI fue uno de los más altos (10,610), en coco resultó de los valores más bajos. Lo que estaría indicando la diversidad existente entre los materiales estudiados en uno y otro caso, reafirmando, además, la versatilidad de la técnica.

Para las combinaciones genotipos/iniciadores llevadas a cabo en el presente estudio, los iniciadores 5'CT y 5'GA mostraron los mayores valores de Rp, siendo las combinaciones 3'TG y 3'GA las menos informativas según este parámetro (ver Tabla 1).

El alto polimorfismo observado (100%) con los ISSRs empleados en el presente trabajo, indican un alto nivel

de variación genética existente entre los individuos analizados.

El análisis del fenograma obtenido muestra que los individuos analizados se distribuyeron en 3 grupos, uno que incluye a los individuos *M. procumbens* var. *flagellaris* y los 3 individuos designados como *Mecardonia* sp (Mec1a Mec8) (Grupo 1, Fig. 2), *M. procumbens* var. *tenella* (Mec 9 a Mec 19) (Grupo 2, Fig. 2) y por último el grupo de *M. procumbens* var. *flagellaris* (Mec20 a Mec25) (Grupo 3, Fig. 2). La separación detectada entre los individuos clasificados como *M. procumbens* var. *flagellaris* (Mec4 a Mec8 y Mec20 a Mec25), agrupados en dos grupos diferentes mostrando baja similitud, coincide con el hecho que los individuos denominados como Mec20 a Mec25 fueron anteriormente considerados como parte de otra especie del género, denominada *M. montevidensis* (Dawson, 1979). En este contexto, es importante aclarar que por más que los índices de similitud sean bajos no implica que los individuos pertenezcan a diferentes taxas. A los efectos de definir si existen, o no, diferencias de especie entre estos individuos y aquellos del grupo Mec4 a Mec8, sería necesario el análisis con un mayor número de iniciadores, como así también estudios filogenéticos más profundos (i.e.: análisis de secuencias de ADN de mitocondria o cloroplasto).

Por su parte, los individuos Mec4 a Mec8 (*M. procumbens* var. *flagellaris*) (Figura 1a) mostraron bajos índices de similitud (0,13 a 0,29) (Figura 2), a este mismo grupo se une el conjunto denominado como *Mecardonia* sp (Mec1:0,18; Mec2 y Mec3: 0,14) de clasificación incierta, pero, tal como se menciona en el párrafo anterior, se debería realizar un estudio que involucre un mayor número de iniciadores, de análisis morfológicos, además de filogenéticos, a fin de obtener datos más concluyentes para clasificar a estos individuos correctamente.

Por otro lado, la Figura 1b muestra una relación genética más estrecha entre las *M. procumbens* var. *tenella* (Mec 9 a Mec 19), este hecho se ve sustentado en los altos índices de similitud que se muestran en la Figura 2 (0,95 a 0,79) y esto se debe a que este grupo particular de individuos, tomado en forma aislada, mostró bandas monomórficas (Figura 1b) con un promedio de 38,95% de bandas polimórficas.

La utilización de *C. linearis* como control resultó efectiva, con un índice de similitud de 0,08. Es importante destacar que los datos obtenidos tuvieron la misma distribución se incluya, o no, *C. linearis* en el cálculo del fenograma (dato no mostrado).

En relación a la cobertura del genoma, siguiendo el criterio adoptado por Bhatia et al. (2009), y bajo las condiciones aplicadas en este estudio, los iniciadores basados en los motivos poli(GA), mostraron una mayor producción de bandas respecto del resto, siendo el iniciador con motivo poli(GT) con el cual se obtuvo el menor número de bandas. Resultados similares, respecto de la capacidad de cobertura del genoma de los iniciadores con motivo poli(GA), por ejemplo, se han reportado tanto en arroz (Blair et al., 1999) como en *Gerbera* (Bathia et al., 2009).

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 referencia a los iniciadores anclados, en el presente estudio no se detectaron diferencias relevantes entre ellos, observándose un promedio de fragmentos amplificados de 72,80±17,29 para los 3' y uno de 88,70±14,20 para los 5'. Lo que estaría reafirmando la fuerte influencia de la interacción genoma/iniciador para la generación de perfiles y el análisis de la variabilidad.

CONCLUSIÓN

Este trabajo representa el primer estudio de marcadores moleculares en el género *Mecardonia*; en el cual la combinación entre genomas/iniciadores utilizados resultó altamente sensible, generando un alto nivel de polimorfismo por lo que fue posible distinguir cada uno de los 25 individuos de la colección analizada, de manera rápida, sencilla y confiable.

Se generó un PIM para cada uno de los materiales analizados, con un promedio de 80 *loci* por entrada, incrementando el número de caracteres a considerar en la descripción de una nueva variedad, y proporcionando otra herramienta eficaz para asegurar tanto los derechos de obtentor como, eventualmente, los del productor.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a Noga Zelener por sus valiosas críticas y sugerencias para este manuscrito. La colaboración de Julián Greppi por su aporte en los aspectos taxonómicos y a Sara Ostertag por su soporte técnico. El presente trabajo se desarrolló en el marco del proyecto INTA, AEBIO 1432: "Desarrollo o adaptación de marcadores moleculares apropiados para asistir el mejoramiento de especies de importancia productiva".

BIBLIOGRAFÍA

Alderete, L., Mori, M., Kato, A. & Escandón, A. 2006. Establishment of an *in vitro* micropropagation protocol for *Mecardonia tenella*. Electronic Journal of

Biotechnology Vol. 9 No. 3, Special Issue. ISSN: 0717-3458. DOI: 10.2225/vol9-issue3-fulltext-6

Azofeifa-Delgado, A. 2006. Uso de marcadores moleculares en plantas; aplicaciones en frutales del trópico. Agronomía Mesoamericana 17(2): 221-242. ISSN: 1021-7444.

Bao, J., Corke, H. & 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.

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. & 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.

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

CIMMYT. 2005. Laboratory Protocols: CIMMYT Applied Molecular Genetics Laboratory. Third Edition. Mexico, D.F. ISBN: 968-6923-30-6.

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

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

Escandón, A.S., Marinangeli, P. y Pérez de la Torre, M. 2010. Parte V Capítulo 4. Avances de la biotecnología en cultivos ornamentales. En: Echenique, V.; Hopp, E.; Rubinstein, C. Y Mroginsky, L. eds. Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II ed. INTA, Buenos Aires, Argentina. En prensa.

Escandón, A., Miyajima, I., Alderete, M., Hagiwara, J.C., Facciuto, G., Mata, D. & 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 montevidensis*. 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. & Miyajima, I. 2005b. Anchored ISSR as molecular marker to characterize accessions of *Jacaranda mimosifolia* L. Don. Proceedings of Vth on New Flor. Crops. ISHS. A.F.C. Tombolato & G.M. Dias-Tagliacozzo eds. Acta Horticulturae 683. pp. 121-127.

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

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., Alderete, L. & 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., Zelener, N., Pérez de la Torre, M., Soto, S.** 2007b. Molecular identification of new varieties of *Nierembergia linariaefolia*, a native Argentinean ornamental plant. *J. Appl. Genet.* 48(2), 115-123.
- García-Mas, J., Graziano E., Aranzana M.J., Monforte, A., Oliver, M., Ballester, J., Viruel, M.A. y Arús, P.** 2000. Capítulo 3. Marcadores de AND: Concepto, tipos, protocolos. Nuez F. y Carrillo J.M. Eds. Editorial U.P.V. ISBN 84-7721-945-1.
- Gupta, P.K., Varshney, R.K., Sharma, P.C. & Armes, B.** 1999. Molecular markers and their applications in wheat breeding. *Plant Breeding* 118: 369-390. ISSN 0179-954.
- Hundsdoerfer A. & Wink, M.** 2005. New Source of Genetic Polymorphisms in Lepidoptera? *Z. Naturforsch.* 60c, 618-624. 0939-5075/2005/0700-0618
- Jain, A., Apparanda, C. & Bhalla, P.** 1999. Evaluation of genetic diversity and genome fingerprinting of *Pandorea* (Bignoniaceae) by RAPD and inter-SSR PCR. *Genome* 42: 714-719.
- Joshi, S.P. Gupta, V.S. Aggarwal, R.K, Ranjekar, P.K. & 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
- Manimekalai, R. & Nagarajan, P.** 2006. Assessing genetic relationships among coconut (*Cocos nucifera* L.) accessions using inter simple sequence repeat markers. *Scientia Horticulturae* 108: 49–54
- Mantel, N.A.** 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Res.* 27, 209–220.
- Maritano, P.; Alderete, L; Pérez de la Torre, M. & Escandón, A.** 2010. *In vitro* propagation and genetic stability análisis of *Evolvulus* spp. Biotechnological tools for the exploration of native germplasm with ornamental potential. *In Vitro and Cell Dev.:* 46 (1): 64-70. DOI 10.1007/s11627-009-9238-2.
- Muthusamy, S., Kanagarajan, S. & 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
- Nuez F., Carrillo, J.M. y de Ron A.M.** 2000. Capítulo 1. Introducción. Los marcadores genéticos en la mejora vegetal. Nuez F. y Carrillo J.M. Eds. Editorial U.P.V. ISBN 84-7721-945-1.
- Nybom, H.** 2004. Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. *Molecular Ecology* 13, 1143–1155 doi: 10.1111 / j.1365-294X.2004.02141.x
- Pérez de la Torre, M., Acevedo, A., Serpa, J.C., Miyajima, I. & 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.
- 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. & Wilkinson, M.J.** 1999. A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars. *Theoretical Applied Genetics:* 98: 107-112.
- Rakoczy-Trojanowska, M. & Bolibok, H.** 2004. Characteristics and a comparison of three classes of Microsatellite-based markers and their application in plants. *Cellular & Molecular Biology Letters.* Volume 9, 221 – 238.
- Rohlf, F.J.** 1998. NTSYS-pc Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, Version 2.02. Exeter Publishing Ltd., Setauket, New York, USA.
- Rossow, R.A.** 1987. Revisión del género *Mecardonia* (Scrophulariaceae). *Candollea* 42(2): 431-474
- Sica, M., Gamba, G., Montieri, S., Gaudio, L. & 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
- Smith, J.S.C., Chin, E.C.L., Shu, O.S., Wall, S.J., Senior, M.L., Mitchel, S.E., Kresovich, S. & 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.
- Souza, V.C.** 1997. Consideraciones sobre la delimitación de *Mecardonia procumbens* (Mill.) Small (Scrophulariaceae). *Acta Bot. Bras.* 11 (2): 181-189.
- Spooner, D.; van Treuren, R. & de Vicente, M. C.** 2005. Molecular markers for genebank management. IPGRI Technical bulletin N° 10. International Plant Genetic Resources Institute.
- Sudupak, M.E.** 2004. Inter and intra-species Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) variations in the genus *Cicer*. *Euphytica* 135:229-238.
- UBC Primer set #9.** Universidad de la Columbia Británica. Vancouver, Canadá.
- Vaccaro, M. S.; Pérez de la Torre, M. C. & 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. 4° Congreso Argentino de Floricultura y Plantas Ornamentales. 10ª Jornadas Nacionales de Floricultura. pp: 502-507.
- Weising, K., Nybon, H., Wolff, K. & Kahl, G.** 2005. Applications of DNA Fingerprinting in Plant Sciences. In *DNA Fingerprinting in Plants. Principles, Methods and Applications* (2nd edition). Taylor and Francis, Eds. CRC Press Boca Raton, London, New York, Singapore. 444 pp.
- Xue-Jun Ge, Yan Yu, Yong-Ming Yuan, Hong-Wen Huang & 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. & 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

Zelener, N., Marcucci Poltri, S.N., Bartoloni, N., López, C.R. & Hopp, H.E. 2005. Selection strategy for a seedling seed orchard design based on both, trait selection index and genomic analysis by molecular

markers: a case study for *Eucalyptus dunnii*. *Tree Physiology* 25: 625-632.

Zietkiewicz, E., Rafalski, A. & Labuda, D. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymorphism chain reaction amplification. *Genomics*: 20: 176-183.