

Tesis Doctoral

Estudios de las relaciones interespecíficas en el género Nierembergia, como herramienta del mejoramiento

Soto, María Silvina

2007

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Soto, María Silvina. (2007). Estudios de las relaciones interespecíficas en el género Nierembergia, como herramienta del mejoramiento. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Soto, María Silvina. "Estudios de las relaciones interespecíficas en el género Nierembergia, como herramienta del mejoramiento". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2007.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



Universidad de Buenos Aires

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Ciencias Biológicas

**ESTUDIOS DE LAS RELACIONES INTERESPECÍFICAS
EN EL GÉNERO *NIEREMBERGIA*, COMO
HERRAMIENTA DEL MEJORAMIENTO.**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el
área Ciencias Biológicas

María Silvina Soto

Directora: **Dra. Sara B. Maldonado**

Consejera de estudio: **Dra. Sara B. Maldonado**

-Instituto de Floricultura, INTA

Buenos Aires-Argentina.

-Laboratory of Floriculture. Chiba University.

Chiba-Japón.

Buenos Aires, 2007.

Estudios de las relaciones interespecíficas en el género
Nierembergia, como herramienta del mejoramiento.

Tesis presentada para por **María silvina Soto**, optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área Ciencias Biológicas

Directora: **Dra. Sara B. Maldonado**

Consejera de estudio: **Dra. Sara B. Maldonado**

Este trabajo de investigación se desarrollo con el aporte de subsidios otorgados por INTA (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria), JICA (Agencia Internacional de Cooperación del Japón) y Chiba University, Laboratory of Floriculture.

Agradezco profundamente:

A *Enrique Suarez* que me acercó al mundo de las flores.

A *Sara Maldonado* por confiar en mi aún sin conocerme, por su presencia y ayuda constante, y sobre todo por transmitirme la fuerza y el gran entusiasmo que la caracteriza como una persona especial.

A *Laura Bullrich* por acompañarme incondicionalmente desde mis inicios en mi formación profesional y personal.

A *Gabriela Facciuto* por permitirme ser su compañera de camino en el estudio y en el trabajo, y demostrarme que de a dos siempre las cosas son más fáciles y se disfrutan mejor.

A *Silvana Sede* compañera de viaje y del mundo filogenético, por estar siempre en todos los momentos que la necesite.

A *Toshiro Ando* y *Hisashi Kokubum* por su colaboración en los estudios moleculares.

A *Andrea Cocucci* por brindarme su apoyo en el mundo de la *Nierembergia*.

A todos mis compañeros del Instituto de Floricultura del INTA Castelar: *Andrea, Juli Y Paula* por ayudarme en los ensayos, *Diego, Alejandro, Juan Carlos, Julián* por acordarse de la *Nierembergia* en los viajes de recolección. *Sara y Zulma* por el cuidado especial de las plantas en el invernáculo. *Nené y Gonzalo* por la ayuda en las gestiones administrativas.

A *Juan Cruz Serpa* por transmitirme el gran potencial del género como ornamental y dejarme como heredera de su trabajo.

A INTA por permitirme realizar mi formación Doctoral.

Al aporte económico y científico por parte de la Agencia de Cooperación del Japón (JICA).

A mis hermanas de la vida *Norma* y *Sandra*, por lo feliz que me hace tenerlas a mi lado siempre.

Y especialmente a mis Padres, *Ani* y *Antonio*, a mi hermana y amiga del alma *Valeria* y a mi cuñado *Ro*, por creer siempre en mí y por hacer de mi familia el mejor lugar del mundo.

INDICE

Resumen.....	I
Abstract.....	II
Publicaciones asociadas a esta Tesis.....	II
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
HIPÓTESIS DE TRABAJO.....	8
CAPÍTULO I: Estudios Filogenéticos	
Introducción.....	10
Materiales y Métodos.....	14
Resultados.....	24
Discusión.....	29
CAPÍTULO II: Estudios de la relación Estigma-Polen/Estilo-Tubo polínico en cruzamientos interespecíficos entre especies del género <i>Nierembergia</i>.	
Introducción.....	32
Materiales y Métodos.....	36
Resultados.....	39
Discusión.....	54
CAPÍTULO III: Embriogénesis y endospermogénesis en híbridos interespecíficos entre <i>N. linariaefolia</i>, <i>N. scoparia</i> y <i>N. ericoides</i>.	
Introducción.....	59
Materiales y Métodos.....	64
Resultados.....	66
Discusión.....	80
CAPÍTULO IV: Híbridos interespecíficos entre <i>N. scoparia</i> y <i>N. ericoides</i>.	
Introducción.....	86
Materiales y Métodos.....	90
Resultados.....	95
Discusión.....	106
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	108
ANEXO I: Metodología y materiales de recolección.....	112
ANEXO II: secuenciación de los fragmentos de cloroplasto utilizados en el estudio filogenético.....	119
ANEXO II: Relación Estigma-Polen/Estilo-Tubo polínico.....	132
ANEXO IV: Cuantificación de ADN; Fertilidad y caracterización de híbridos	137
ANEXO V: Clones selectos.....	140
BIBLIOGRAFÍA.....	144

Estudios de las relaciones interespecíficas en el género *Nierembergia*, como herramienta del mejoramiento.

Resumen

Antecedentes y objetivos: Esta tesis forma parte del programa de mejoramiento genético en el género *Nierembergia*, que iniciara en 2002 en el Instituto de Floricultura de INTA. Los objetivos generales que propuse al iniciarla, fueron: (i) conocer la compatibilidad interespecífica entre las especies nativas de valor ornamental y (ii) obtener híbridos interespecíficos como fuente de variación en el mejoramiento.

Material y Métodos: En primer lugar se buscó establecer el grado de cercanía entre ocho especies del género *Nierembergia*: *N. aristata*, *N. browalloides*, *N. calycina*, *N. ericoides*, *N. micrantha*, *N. linariaefolia* var. *linariaefolia*, *N. scoparia*, *N. veitichii* en un análisis filogenético con los datos obtenidos usando el gen *rpl14* y los espacios intergénico (IGS) *trnK* y *trnL*, como marcadores moleculares. En estas mismas especies se realizaron cruzamientos dirigidos aplicando polinización artificial seguida del estudio de la germinación de los granos de polen sobre el estigma y el crecimiento de los tubos polínicos a lo largo de los pistilos. Esto último permitió establecer la relación Estigma-Polen/Estilo-Tubo polínico (EPET) entre todas las especies consideradas. Con el fin de estudiar las barreras post fertilización tanto en los cruzamientos compatibles como en los incompatibles, se estudió del desarrollo del endosperma y del embrión. Finalmente se caracterizaron los híbridos interespecíficos.

Resultados claves y Conclusiones: El análisis filogenético reveló la formación de tres subclados *N. veitichii-N. aristata*, *N. linariaefolia-N. micrantha* y *N. scoparia-N. ericoides* La distancia filogenética entre las especies que integran cada uno de ellos, fue corroborada por el análisis de compatibilidad interespecífica, y por los resultados de los estudios de endospermogénesis y embriogénesis. La combinación entre *N. ericoides* y *N. scoparia* resultó compatible, presentándose como óptima para la obtención de híbridos interespecíficos. En este género, el análisis filogenético utilizando los genes el gen *rpl14* y los espacios intergénico (IGS) *trnK* y *trnL* constituye una herramienta del mejoramiento que permite predecir la compatibilidad interespecífica y consecuentemente obtener híbridos estables.

Palabras claves: *Nierembergia*, Solanaceae, hibridación interespecíficos, relación Estigma-Polen/-estilo-Tubo polínico, filogenia, embriogénesis, endospermogénesis; *rpl14*;(IGS) *trnK*; *trnL*.

Interspecific relationship studies in the genus *Nierembergia* as a tool for genetic improvement.

Abstract

Backgrounds and aims: This study is part of the Genetic Improvement Program for the genus *Nierembergia* that commenced in 2002 in the Instituto de Floricultura of INTA. The general objectives that I proposed upon initiating it were: (i) determine interspecific compatibility between native species with ornamental value; and (ii) obtain interspecific hybrids as a source of variation in the improvement.

Material and Methods: The first step was to establish the degree of proximity among eight species from the genus *Nierembergia*: *N. aristata*, *N. browalloides*, *N. calycina*, *N. ericoides*, *N. micrantha*, *N. linariaefolia* var. *linariaefolia*, *N. scoparia*, *N. veitichii* in a phylogenetic analysis with data obtained using the gen *rpl14* and the intergenetic spacers (IGS) *trnK* and *trnL*, as molecular markers. In these species, directed crossings were carried out for both pollen germination (on the stigma) and pollen tube growth (along the pistils). The latter allowed for establishment of the relationship Stigma-Pollen/Style-Pollen tube (SPST) in all of the crossings. Endosperm and embryo development were analyzed in order to study the post-fertilization barriers in both the compatible and incompatible crossings. Finally, the characteristics of the interspecific hybrids obtained were described.

Key Results and Conclusion: Phylogenetic analysis revealed the formation of three subclads: *N. veitichii*-*N. aristata*, *N. linariaefolia*-*N. micrantha* and *N. scoparia*-*N. ericoides*. The conclusions reached concerning the phylogenetic distance between the species that integrate each one of these was coincided with that from both compatibility and embryological studies. The combination between *N. ericoides* and *N. scoparia* was compatible, allowing production of interspecific hybrids. In this genus, phylogenetic analysis using the gene *rpl14* and the intergenetic spacers (IGS) *trnK* y *trnL* constitutes a tool for genetic improvement that permits the prediction of interspecific compatibility and, consequently, obtainment of stable hybrids.

Key Words: *Nierembergia*, *Solanaceae*, interspecific hybridization, relationship Stigma-Pollen/Style-Pollen tube, phylogenetic, endosperm and embryo development; *rpl14*;(IGS) *trnK*; *trnL*.

PUBLICACIONES ASOCIADAS A ESTA TESIS

En Revistas:

Soto S, Pannunzio M J, Bologna A, Facciuto, G. 2007. Interspecific hybridization in *Nierembergia*: a source of variation. *Acta Horticulturae* (en prensa).

Soto M S, Bullrich L, Mata D, Facciuto G, Serpa J C, Hagiwara J C, Morisigue D, Miyajima I, Kobayashi N. 2005. New clones of *Nierembergia linariaefolia* obtained from population native to Argentina. *Acta Horticulturae* 683: 407-410

Escandón A, Perez de la Torre M, Soto S, Zelener N. 2005. Identificación de clones selectos de *Nierembergia linariaefolia* mediante microsatélites anclados. *RIA* 34(1):5-7.

En Capítulo de Libro:

Facciuto G, Soto S, Maldonado S. Domestication and breeding of ornamental plants native to Argentina: the cases of *Tabebuia* and *Nierembergia* genera. En: *Global Science Books* (en prensa)

En Congresos Nacionales e Internacionales:

Soto S, Pannunzio J, Bologna A, Facciuto G. 2007. Interspecific hybridization in *Nierembergia*: a source of variation. *VI International Symposium on New Floricultural Crops*. Madeira-Portugal.

Soto M S, Facciuto G, Coviella M A, Pannunzio M J, Bullrich L, Maldonado S. 2006. Estudios de la receptividad astigmática en el género *Nierembergia* como herramienta del mejoramiento *III Congreso Nacional de Floricultura*. La Plata-Argentina.

Soto S, Kokubum H, Facciuto G, Sede S. 2005. Preliminary Phylogenetic study in eight *Nierembergia* species native to Argentina: relationships with the interspecific congruence. *45 Congresso Brasileiro de Olericultura, 15 Congreso Brasileiro de Floricultura e Plantas ornamentais y 2 Congresso Brasileiro de Cultura de tecidos de Plantas*. Foratleza-Brasil.

Soto M S, Mori M, Facciuto G, Kato A. 2005. Cultivo de meristemas de Estrella INTA-JICA y Luna INTA-JICA. Dos variedades de *Nierembergia linariaefolia*. *V Simposio de Recursos Genéticos para América latina y el Caribe*. Montevideo-Uruguay.

Perez de la Torre M, Escandón A, Soto MS. 2005. *Nierembergia* I. Construcción de un perfil de identificación molecular en nuevas variedades de *N. linariaefolia* mediante microsateles anclados. *BAIRESBIOTEC2005. Congreso Internacional – Grupo Biotecnologico. VI Simposio Nacional de Biotecnología – REDBIO Argentina 2005. Encuentro Trinacional REDBIO Argentina – Chile – Uruguay*. Buenos Aires-Argentina.

Perez de la Torre M, Zelener N, Escandón A, Soto M.S. 2005. *Nierembergia* II. Caracterización molecular de nuevas variedades de *N. linariaefolia* mediante AFLPs y ISSRs. *BAIRESBIOTEC2005. Congreso Internacional – Grupo Biotecnologico. VI Simposio Nacional de Biotecnología – REDBIO Argentina 2005. Encuentro Trinacional REDBIO Argentina – Chile – Uruguay*. Buenos Aires-Argentina.

Soto M S, Mata D, Morisigue D, Facciuto G, Bullrich L, Escandón A, Bualó R, Miyajima I. 2004. Evaluación de cuatro clones selectos de *Nierembergia linariaefolia* desarrolladas en Argentina bajo condiciones de producción. *II Congreso Argentino de Floricultura y Plantas Ornamentales. VI Jornada de*

Floricultura. I Encuentro Latinoamericano de Floricultura. Buenos Aires-Argentina.

Soto S, Bullrich L, Mata D, Facciuto G, Serpa J C, Hagiwara J C, Morisigue D, Miyajima I, Kobayashi I 2003. New clones of *Nierembergia linariaefolia* obtained from population native to Argentina. *V International Symposium on New Floricultural Crops* Iguazu Falls-Brasil.

Soto S.; Kokubum H; Fernandez M, Facciuto G; Hagiwara JC; Mata D, Serpa J C. 2002. Ruptura de la auto-incompatibilidad a través de poliploidía inducida en *Nierembergia linariaefolia*. *I Congreso Argentino de Floricultura y Plantas Ornamentales.* Buenos Aires-Argentina.

INTRODUCCIÓN GENERAL

Taxonomía del género *Nierembergia*.

La familia *Solanaceae* Adans., cuenta con 92 géneros y 2300 especies. Muchos de los miembros de esta familia son fuentes de recursos para la industria farmacéutica, tal es el caso de *Nicotiana* L., *Datura* L. y *Atropa* L., así como también otros miembros son importantes fuentes de alimento como: *Capsicum* L., *Lycopersicum* Hill., *Physalis* L. y sobre todo *Solanum* L. Otro uso encontrado en muchos de sus géneros es el ornamental, en el cual se incluyen géneros como: *Brunfelsia* L., *Cestrum* L., *Nierembergia* Ruiz & Pav., *Petunia* Juss., *Physalis*, *Solanum* entre otros (Hunziker, 2001; Judd *et al.* 1999).

La familia *Solanaceae* se divide en 6 subfamilias: *Cestroidae* Schltld. (8 tribus, 23 géneros y 47 especies), *Juanulloideae* (Hunz.) Hunz. (1 tribu y 9 géneros), *Solanoideae* Schltld (9 tribus, 50 géneros y 1727 especies), *Salpiglossoideae* (Benth.) Hunz. (1 tribu, 2 géneros y 6 especies), *Schizanthoideae* (Miers) Hunz. (1 tribu, 1 género y 12 especies), *Anthocercidoideae* (G. Don) Tètènyi (1 tribu, 7 géneros y 31 especies) (Hunziker, 2001).

El género *Nierembergia* pertenece a la subfamilia *Cestroidae*, Tribu *Nicotianeae* G. Don y subtribu *Nierembergiinae* Hunz., y está constituido por 20 especies presentes en el sur de América y una en México (*N. angustifolia* H. B. & K.). En la Argentina habitan 15 especies (Zuloaga, 1999), en una altitud que se extiende desde el nivel del mar hasta 3500 msm. (Cocucci, 1995).

Antecedentes de uso ornamental del género *Nierembergia* en el mundo.

Muchas de las especies en el género presentan un gran valor ornamental por el color de sus flores y el largo período de floración, la variabilidad fenotípica dentro del género, la amplia distribución geográfica, entre otras características (Shizukawa *et al.* 1997).

Otro aspecto interesante de las especies de este género es que, aunque son perennes, presentan características de plantas de ciclo anual. Wilkins y Anderson (2006) hacen referencia a la importancia de las especies herbáceas que conjugan características de especies de ambos ciclos. El hecho de que sean perennes les otorga durabilidad en los jardines. Esto último evita tener que renovarlas todos los años y favorece el bajo costo de mantenimiento, un aspecto importante en la producción ornamental. Ambas ventajas se conjugan con características frecuentes en plantas de ciclo anual como floración temprana (menor a 16 semanas desde semillas), baja estatura, bajos requerimientos nutricionales, resistencia a enfermedades (Wilkins y Anderson, 2006).

En 1997 dos especies fueron introducidas en Japón para su uso ornamental; *N. repens* Ruiz & Pav. (Shizukawa *et al.* 1997) y *N. scoparia* Sendtn (Godo *et al.* 1997). También en Japón *N. scoparia* fue transformada exitosamente para la obtención de plantas compactas para su uso en maceta y/o cobertura de suelo (Godo *et al.* 1997).

En el ensayo de cultivares por semillas realizado en el estado de Michigan (USA), (Flower Seed Trials, 1999) fue presentado el primer cultivar correspondiente a *Nierembergia linariaefolia* Ruiz & Pav. de la compañía americana *Ball Seed Company*, “Mont Blanc” (Fig. 1a). Si bien actualmente el género no cuenta con muchas variedades, en el ensayo realizado por la Universidad de Florida (USA) en el año 2006 (UF Trials Garden, 2006) se muestran tres nuevos cultivares (Fig. 1a-c), dos pertenecientes a la compañía japonesa *Suntory*: “Summer Splash Compact White” (Fig. 1c) y “Summer Splash Patio White” y un tercero a la empresa americana *Select First Class*: “Lara White” (Fig.1b).



Figura 1: Variedades comerciales de *Nierembergia* actualmente en el mercado. **a** – “Mont Blanc”, *Ball seed Company*. **b**- “Lara White”, *Select First Class*, **c** – “Summer Splash Compact White”, *Suntory*. **Aumento:** barra= 10 cm. (**a**, **b**, **c**)

Antecedentes de uso ornamental del género *Nierembergia* en la Argentina.

En la Argentina, el estudio del género desde el punto de vista ornamental comenzó en el año 1999, en el marco del Proyecto “Desarrollo de la Floricultura en la Argentina” (Suárez *et al.* 2003).

El género *Nierembergia* fue uno de los géneros seleccionado para iniciar un plan de mejoramiento en el Instituto de Floricultura (IF) del INTA Castelar. En el marco de ese proyecto se realizaron numerosos viajes de recolección con el objetivo de incorporar material con suficiente variabilidad, desde zonas de origen, para comenzar un plan de mejoramiento. Durante los dos primeros años se incorporaron 163 entradas correspondientes al género *Nierembergia* (Soto *et al.*, 2003) (Fig. 2) (Anexo I- A).



Figura 2: Material recolectado en zona de origen del género *Nierembergia*. **a-** *N. aristada*, Corrientes). **b-** *N. graveolens*, Entre Ríos. **c-** *N. linariaefolia* var. *linariaefolia*, Entre Ríos. **d-** *N. linariaefolia* var. *glabriuscula*,. **e-** *N. linariaefolia* var. *glabriuscula*. . **Aumento:** barra= 10 cm. (**c, b, d, e**)

Para evaluar la factibilidad de su cultivo como ornamental, las entradas se caracterizaron bajo condiciones de invernáculo y a campo, teniendo en cuenta la variabilidad en color y tamaño de flor dentro de las entradas recolectadas (Fig. 3) y la arquitectura en maceta según los diferentes portes (Fig. 4) (Soto *et al.* 2004) (Facciuto, 2007) (Anexo I-A).



Figura 3: Variabilidad en tamaño y colores en flores del género *Nierembergia*. **a** - *N. linariaefolia* var. *Linariaefolia*. **b** - *N. linariaefolia*. **c** - *N. linariaefolia* variedad comercial. **d** - *N. veitchii*. **e** - *N. micrantha*. **f** - *N. linariaefolia*. **Aumento:** barra= 1 cm. (**a, b, c, d, e, f**)

En el mejoramiento del género *Nierembergia* se utilizaron métodos tradicionales, basados en cruzamientos y selección. Se obtuvieron plantas con características superiores desde el punto de vista ornamental con respecto de la población original, las cuales fueron evaluadas en establecimientos productivos (Soto *et al.* 2004). Esta evaluación permitió la obtención de variedades comerciales las que fueron registradas en el *Registro Nacional de Cultivares*.

N. linariaefolia, fue la primera especie del género con la cual comenzaron los trabajos de mejoramiento en la Argentina, existiendo actualmente dos variedades

comerciales registradas en nuestro país “Luna INTA-JICA” y “Estrella INTA-JICA” (Soto *et al.* 2005).



Figura 3: Variabilidad en portes del género *Nierembergia* **a** - *N. linariaefolia* var. *linariaefolia*. **b** - *N. calycina*. **c**- *N. rigida*. **d** - *N. veitichii*. **e** - *N. linariaefolia* var. *pampeana*. **f** - *N. browalloides*. **Aumento:** barra= 10 cm. (**a, b, c, d, e, f**)

Para contribuir y asegurar la propiedad de las variedades se realizaron trabajos de identificación de variedades por técnicas moleculares. Se pusieron a punto los protocolos para la técnica de microsatélites anclados (ISSR – Inter-Simple Repeat), método basado en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Escandón *et al.* 2005; Pérez de la Torre *et al.* 2004).

Cabe destacar que todos los trabajos realizados en el mejoramiento de *Nierembergia* estuvieron orientados hacia la utilización de la variabilidad genética

intraespecífica. Con el objetivo de aumentar la variación existente se comenzó a utilizar la hibridación interespecífica, una de las metodologías más efectivas evaluadas en los programas de mejoramiento que se realizan en cultivos ornamentales (Van Tuyl y De Jeu, 2005). Asimismo en el mejoramiento de cultivos extensivos, actualmente hay una utilización marcada de cruzamientos interespecíficos y/o intergenéricos entre cultivares y especies salvajes para recuperar o incorporar nuevos genes (Shivanna *et al.* 2005) (Handa, 2003).

La incorporación de cruzamientos interespecíficos para la obtención de híbridos requiere conocer la relación entre las especies, las barreras de incompatibilidad, así como también los diferentes factores involucrados. El éxito en la obtención de híbridos interespecíficos, se sostiene en la posibilidad de identificar la relación filogenética (Handa, 2003) y las barreras de incompatibilidad (Shivanna, 2005) entre las especies parentales. Teniendo en cuenta que nada se conoce en *Nierembergia* sobre los aspectos anteriormente mencionados, se delinearón los objetivos de esta tesis:

- (i) En el género *Nierembergia*, conocer la compatibilidad interespecífica entre ocho especies nativas con valor ornamental;
- (ii) En el género *Nierembergia*, obtener híbridos interespecíficos como fuente de variación.

LAS HIPÓTESIS DE TRABAJO

Hipótesis General

Los estudios filogenéticos, embriológicos y citológicos permiten detectar las especies parentales putativas para la obtención de híbridos.

Hipótesis particulares

- En el género *Nierembergia*, el uso del gen *rpl14* y los espacios intergénicos (IGS) *trnK* y *trnL* como marcadores moleculares resulta operativo para detectar las relaciones filogenéticas entre ocho especies pertenecientes al género *Nierembergia*.
- La filogenia y las relaciones estigma-polen/estilo-tubo polínico (EPTE), se correlacionan con la compatibilidad interespecífica en las especies evaluadas.
- El desarrollo anómalo del endosperma y/o embrión y/o endotelio en los híbridos interespecíficos está asociado con la distancia filogenética de las especies parentales.

Capítulo I

Estudios filogenéticos

INTRODUCCIÓN

Los estudios taxonómicos en plantas se sustentan principalmente en caracteres morfológicos, anatómicos, palinológicos, cariológicos, compuestos secundarios, proteínas. Desde la década del 80 los estudios moleculares han pasado a ser utilizados como caracteres taxonómicos e incorporados en aquellos grupos en los que los caracteres utilizados tradicionalmente no permiten resolver los problemas taxonómicos (Steven, 1986; González, 1997; Judd *et al.* 2002).

Entre los distintos tipos de caracteres moleculares, la secuenciación génica constituye el más recomendado debido a la información potencial que ofrece para inferir historia filogenética, información que sólo está limitada por el tamaño del genoma (Hillis *et al.* 1990).

La utilización de secuencias de ADN de cloroplasto fue el primer recurso de datos moleculares utilizados para inferir la filogenia en plantas (Judd *et al.* 2002). En los últimos años la validez de este recurso fue corroborado, en algunas ocasiones, por el estudio de secuencias nucleares de ITS ribosomal (Shaw *et al.* 2005). Cabe destacar que las ventajas del uso del genoma de cloroplasto para estudios filogenéticos, son: (i) su tamaño pequeño y su factibilidad para ser aislado de la célula fácilmente (González, 1997); (ii) el hecho de contener varios genes potencialmente útiles para estos estudios (30 genes que codifican para ARN de transferencia, 55 para proteínas de función conocida en la fotosíntesis y 30 para proteínas no identificadas) (González, 1997); (iii) su estabilidad entre especies, haciéndolo óptimo para detectar relaciones filogenéticas entre grupos superiores al de la especie (géneros, familias, órdenes) (Judd *et al.* 2002).

Las primeras regiones utilizadas fueron *trnT-trnL-trnL-trnF*, *atpB-rbcL* y la porción del intrón no codificante *trmK/matK* (Shaw *et al.* 2005). Un sondeo de las publicaciones en el período 1995 – 2002 en *American Journal of Botany*, *Systematic Botany*, *Molecular*

Phylogenetics and Evolution and Plant Systematic and Evolution revelan un marcado incremento en la utilización de regiones no codificantes de ADN de cloroplasto en investigaciones filogenéticas (Shaw *et al.* 2005).

Si bien el uso más frecuente del ADN de cloroplasto se encuentra en estudios sistemáticos y evolutivos básicos (González, 1997), también ha sido usados en trabajos agronómicos. Al respecto, Handa (2003) reporta el uso de caracteres moleculares de cloroplastos en los géneros *Menziesia* Sm. (*Ericaceae*) y *Dendrobium* Sw. (*Orchidaceae*) no sólo para obtener información filogenética sino además para la introducción de nuevos recursos y/o la selección de especies cercanas, para la introgresión de características de interés ornamental. Por otro lado, los estudios filogenéticos realizados en variedades comerciales pertenecientes al género *Rosa* L., usando de las secuencias *trnL-F* y *psbA-trnH* como marcadores moleculares, permitieron determinar su origen natural y comprender la evolución y el proceso de mejoramiento que dio lugar a dichos cultivares (Bruneau *et al.* 2007).

La familia *Solanaceae* se presenta pionera con respecto a la secuenciación del genoma de cloroplasto (cpADN), a partir de la secuenciación completa de *Nicotiana tabacum* (Taberlet *et al.* 1991). Además, estudios realizados con datos provenientes de cpADN ayudaron a resolver muchos problemas presentes en la sistemática de *Solanaceae* en géneros tales como *Solanum* (Palmer y Zamir, 1982), *Nicotiana* (Olmstead y Palmer, 1991), *Jaltomata* Schlecht. (Mione *et al.* 1994) y *Physalis* con géneros relacionados (Mione *et al.* 1994).

En este capítulo se describe el estudio de las relaciones filogenéticas en plantas de especies de nativas de interés ornamental pertenecientes a otro género de *Solanaceae*, el género *Nierembergia*, utilizando las secuencias cloroplastídicas del gen *rpl14* y de los espacios intergénicos (IGS) *trnK* y *trnL*, como marcadores moleculares con el fin de

identificar aquellas con mayor cercanía genética y utilizar estos datos como base para incrementar variación a través de la hibridación interespecífica.

OBJETIVOS

- Establecer las relaciones filogenéticas entre las especies nativas de interés ornamental pertenecientes al género *Nierembergia*, utilizando las secuencias del gen *rpl14* y de los espacios intergénicos (IGS) *trnK* y *trnL*, como marcadores moleculares.

- Identificar las especies que son genéticamente más cercanas para obtener híbridos interespecíficos.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIAL VEGETAL

Las especies utilizadas para la extracción de ADN se listan a continuación:

Espece	Localidad	Voucher
<i>Nierembergia</i>		
<i>N. aristata</i>	Argentina. Corrientes, San Luis del Palomar	Soto 20021120d1 (BAB)
<i>N. browalloides</i>	Argentina. Entre Ríos, La Paz	Soto 20040920g1 (BAB)
<i>N. calycina</i>	Argentina. Entre Ríos, Concordia	Soto 20040920h1 (BAB)
<i>N. micrantha</i>	Argentina. Misiones, Leandro N. Alem	Soto 20041119b1 (BAB)
<i>N. linariaefolia</i> var <i>linariaefolia</i>	Argentina. Entre Ríos, Diamante	Soto 1999010226 (BAB)
	Argentina. Entre Ríos, Colon	Soto 20000920f1(BAB)
	Argentina. Corrientes, Santo Tomé	Soto 20021122c1(BAB)
	Argentina. Misiones, Oberá	Soto 20010926g1 (BAB)
<i>N. scoparia</i>	Argentina. Entre Ríos, Gualeguaychu	Soto 20031213a1(BAB)
<i>N. veitchii</i>	Argentina. Catamarca, Cuesta del Portezuelo	Soto 20031118a1 (BAB)
	Argentina. Catamarca, Cuesta del Portezuelo	Soto 20031118a2(BAB)
<i>N. ericoides</i>	Argentina. Buenos Aires, Tandil	Soto 20020320b2 (BAB)

METODOLOGÍA

Extracción de ADN total

La extracción del ADN se realizó a partir de 20 mg de hoja. Se siguió el protocolo de Doyle y Doyle (1987) con algunas modificaciones.

- ⇒ El tejido se congeló con nitrógeno líquido y se lo pulverizó en un mortero.
- ⇒ El pulverizado fue transvasado a un tubo Eppendorff de 1.5 ml y se añadió 500 µl de *buffer* de extracción (100 mM tris- HCL pH 8; 20 mM EDTA; 1.4 M NaCL; 2% p/v CTAB; 0.2% v/v B- mercaptoetanol) a 60 °C.
- ⇒ La muestra se incubó durante 1 hora a 65 °C con agitación.
- ⇒ Se realizó una extracción con una mezcla de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1 v/v). Se agitó fuertemente y se centrifugó a 12.000 x g por 30 segundos a 20-25 °C para separar las fases.
- ⇒ Evitando la interfase, con pipeta se excluyó la fase acuosa.
- ⇒ Se agregó 0.5 volúmenes de NaCL 5 M e isopropanol 40%. Se mezcló suavemente y se incubó a -20 °C por 20 minutos.
- ⇒ Se centrifugó a 12.000 x g durante 1 minuto a 20-25 °C.
- ⇒ Se eliminó el sobrenadante tratando de no tocar el pellet de ADN. Se realizaron 2 lavados con alcohol 75%: se agregó 0.5-1 ml de alcohol al pellet y se agitó suavemente. Luego se dejó reposar por 15-20 minutos.
- ⇒ Se centrifugó a 12.000 x g durante 1 minuto a 20-25 °C. Se eliminó el sobrenadante y el pellet obtenido se dejó secar durante 10 minutos.
- ⇒ Se resuspendió la muestra en 20 µl de agua destilada.

Cuantificación y control de la calidad de ADN

Se sembraron 2 µl de cada muestra en geles de agarosa 0.8% con bromuro de etidio (0.1 µg/µl), TAE 1X. La electroforesis se llevó a cabo a 4.5 v/cm (corriente constante) durante 1 hora.

Los geles se visualizaron en un transiluminador de UV y se fotografiaron. Para la cuantificación se incluyó en el gel, el estándar de masa de “DNA High DNA Mass TM Ladder” (Life Technologies –Gibco BRL, EUA).

Amplificación del espacio intergénico (IGS) *trnL*

Los fragmentos correspondientes al IGS *trnL* fueron amplificados a partir del ADN total de los distintos individuos analizados.

Los *primers* b, c, d y e (Fig. 1 1) utilizados fueron sintetizados sobre la base de la secuencia descrita por Taberlet *et al.* (1991).

Secuencias de los *primers*:

TFb 3':TCTACCGATTTTCGCCATATC
TFc 5':CGAAATCGGTAGACGCTACG
TFd 3':GGGGATAGAGGGACTTGAAC
Tfe 5':GGTTCAGTCCCTCTATCCC

La reacción se llevó a cabo con 10 ng de ADN molde; 2.5 µl de buffer de reacción 10 X; 0.2 mM de dNTP's; 0.8 µM de *primers*; 3.0 mM de MgCl₂ y 0.5 U de Taq polimerasa en un volumen final de 25 µl, en un termociclador programable (Mastercycler personal).

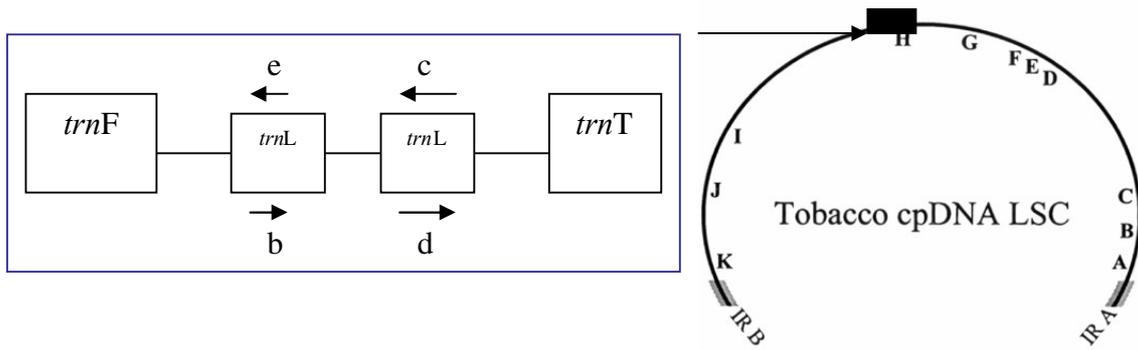


Figura 1: Esquema del genoma del ADN de cloroplasto (Wakasugi *et al.* 1998), indicando la región analizada. A la izquierda, se representan los *primers* que se utilizaron en la reacción de PCR para amplificación de *trnL* (e), *trnL* (d) y el intrón *trnL* (c y b). Las flechas indican la posición de hibridación de los *primers* (Taberlet *et al.* 1991)

Las condiciones de PCR fueron: (i) desnaturalización inicial de 10 min. a 95 °C; (ii) 30 ciclos de las siguientes condiciones: 60 seg. a 95 °C, 75 seg. a 50 °C, 120 seg. a 72 °C y extensión final de 10 min. a 72 °C.

Los productos de amplificación fueron corridos electroforéticamente en geles de agarosa al 1.5 % con bromuro de etidio, en TAE 1X, se visualizaron con luz UV y se fotografiaron.

Amplificación del espacio intergénico (IGS) entre los genes *trnK*

Los fragmentos correspondientes al IGS *trnK* fueron amplificados a partir del ADN total de los distintos individuos analizados. Los *primers* (3914K; 2R; AF; BR; Nic1F; Nic3F) (Fig. 2) utilizados fueron sintetizados sobre la base de la secuencia descrita por Taberlet *et al.* (1991).

Las condiciones de reacción y los ciclos de amplificación fueron los mismos que para la región anteriormente descrita (*trnL*).

Secuencias de los primers:

trnK-3914F 5':CGGGTTGCTAACTCAACGG,
 trnK-2R 3':AACTAGGCTGATGGAGTG,
 matK-AF 5': CTATATCCACTTATCTTTTCAGGAGT,
 matK-BR 3': CCACAATAAACGCAAATCCCT,
 matK-Nic1F 5': GGTTCAAACTCTTCGCTATTGGGTA,
 matK-Nic3F 5':CGATTTGGGCGTATATGCAG

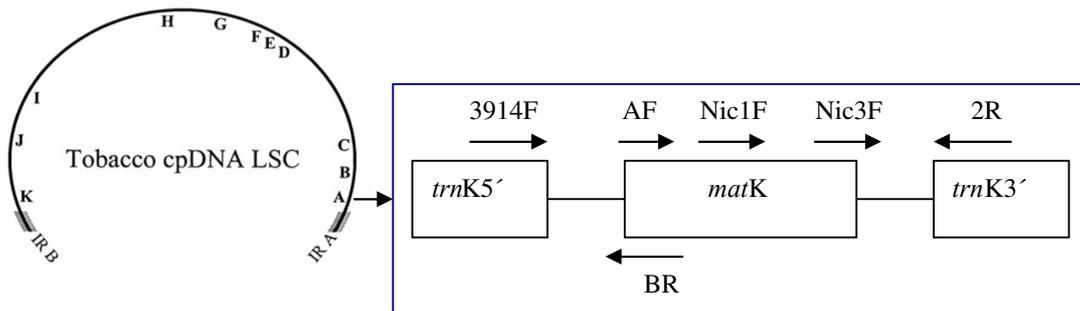


Figura 2: Esquema del genoma del ADN de cloroplasto (Wakasugi et al. 1998), indicando la región analizada. A la derecha se representan los primers que se utilizaron en la reacción de PCR para amplificación el IGS *trnK5' –matK* (3914F; BR), *trnK3' –matK* (Nic3F: 2R) y el gen *matK* (AF: Nic1F). Las flechas indican la posición de hibridación de los primers (Taberlet *et al.* 1991).

Amplificación del gen *rpl14*.

El fragmento correspondiente al gen *rpl14*, fue amplificado a partir del ADN total de los distintos individuos analizados. Los primers (*rpl14: rpl14*) (Fig. 3) utilizados fueron sintetizados sobre la base de la secuencia descrita por Taberlet *et al.* (1991).

Secuencias de los primers

rpl14 5':AAAGATCTAGATTTTCGTAAACA ACATAGAGGAAGAA
rpl14 3':ATCTGCAGCATTAAAAGGGTC TGAGGTTGAATCAT

Las condiciones de reacción en los ciclos de amplificación fueron las mismas que para la región IGS *trnK*..

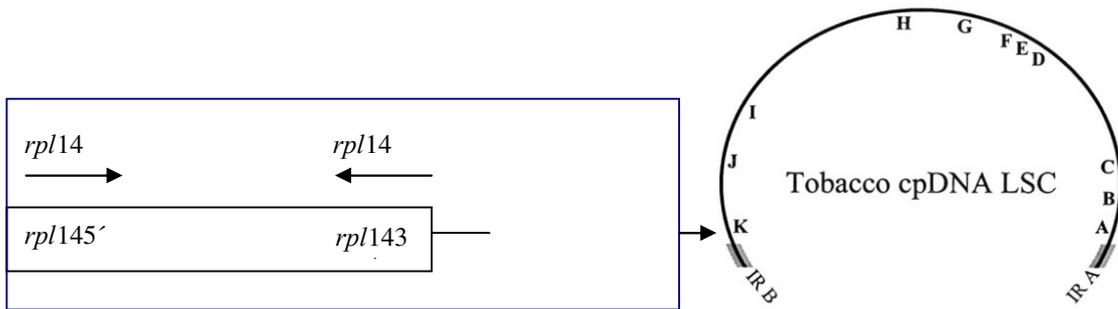


Figura 3: Esquema del genoma del ADN de cloroplasto (Wakasugi et al. 1998), indicando la región analizada. A la izquierda se representan los *primers* que se utilizaron en la reacción de PCR para amplificación *rpl14* (*rpl14*: *rpl14*) Las flechas indican la posición de hibridación de los primers (Taberlet *et al.* 1991).

Purificación y secuenciación de los productos amplificados

Para la purificación cada muestra se suspendió en 200 µl de agua destilada, posteriormente filtrada (P200) y sometida a una centrifugación de 3500 r.p.m. durante 5 min, quedando retenida en el filtro. Seguidamente sobre el filtro se agregó 20 µl de agua destilada para recuperar la muestra mediante centrifugación a 3500 rpm durante 2 minutos. La calidad de ADN amplificado se verificó en gel de agarosa de 0.8 % (en TAE 1 X con bromuro de etidio 1:100 v/v).

Para la secuenciación se realizó una reacción con 100-200 ng/µl de ADN plásmido, 2µl de BigDye V3.1, 1µl de buffer de secuenciación 5x, 3.2µl de *primers* (1µM). Las condiciones de PCR fueron: (i) inicial de 2 min. a 96 °C; (ii) seguidos por 25 ciclos de las siguientes condiciones: 30 seg. a 96 °C, 15 seg. a 53 °C, 4 min. a 60 °C para los *primers* *rpl14* y *trnK*, y 30 seg. a 96 °C, 15 seg. a 48 °C, 4 min. a 60 °C para el *primer* *trnL*.

Para la secuenciación fue utilizado un Secuenciador ABI Prism 3100 Genetic Analyzer Sequencing Chemistry.

Edición de secuencia

La edición de las secuencias se realizó con el programa “BioEdit Sequence Alignment Editor”, de utilización gratuita, Este programa permitió editar cromatogramas de secuencia y reconstruir una secuencia completa de la molécula de ADN a partir de secuencias más cortas (<http://services.bioesp.nl/blat/cgi-bin/blst.cgi?program=blastn>).

Determinación de homologías primarias: construcción de la matriz de datos

Para la construcción de una matriz de datos, las secuencias completas obtenidas se alinearon por medio del programa DIALIGN (Morgenstern *et al.*, 1996). El algoritmo utilizado por este programa se basa en la comparación de segmentos completos de secuencias con una similitud total alta y no en la comparación de residuos individuales.

La exclusión de alineación de las regiones de baja similitud, permitió la detección y el alineamiento correcto de regiones similares cortas en secuencias largas de baja similitud total. En este programa, el algoritmo produce en primera instancia, alineamientos de a pares sólo para preseleccionar aquellos segmentos que serán incluidos en el alineamiento múltiple y por lo tanto, a diferencia de otros programas, es independiente del orden en el cual se construyen los alineamientos de a pares. Este programa posee poca dependencia de parámetros definidos por el usuario. Las inserciones/delecciones no son penalizadas en este algoritmo y permanecen como aquellas partes de las secuencias que no corresponden a ninguno de los segmentos alineados. El único parámetro que debe ser definido es T (de *threshold*), con valores desde 0 a 10. Este parámetro limita el número de segmentos en consideración para retener sólo aquellos que tienen muy buena chance de ser relevantes en el nivel biológico. Sin embargo, Morgenstern *et al.* (1996) sostienen que T puede ser variado considerablemente sin cambiar esencialmente los resultados y no es importante darle un valor en secuencias de ADN cortas o de proteínas. Se realizó la alineación de la matriz con valores de $T= 10$.

Análisis filogenético

La construcción de las hipótesis filogenéticas se realizó mediante el método cladístico, que es en la actualidad el método más utilizado en sistemática.

Para la construcción filogenética se utilizó el programa NONA (Goloboff, 1998) activado desde Winclada (Nixon, 2002). La búsqueda de árboles más parsimoniosos se realizó sobre 100 secuencias de adición al azar reteniendo 10 árboles con cada búsqueda (h1000 h/10 mu100). Los caracteres no informativos fueron excluidos.

Elección de grupo externo

Se seleccionaron tres especies pertenecientes a la familia de las *Solanaceae* tribu *Nicotianinae*; *Fabiana imbricata* Ruiz & Pav., *Leptoglossis linifolia* (Miers) Griseb. y *Bouchetia anomala* (Miers) Britton & Rusby. Esta última es la especie que se encuentra más cercana al género *Nierembergia*, utilizándose en este análisis para corroborar la monofilia por pertenecer a la misma subtribu (*Nierembergiinae*) (Hunziker, 2001). El número de tres especies se hizo teniendo en cuenta la sugerencia de Nixon y Carpenter (1993), quienes señalan que, cuanto mayor sea el número de taxones en el grupo externo, más precisa será la inferencia filogenética.

Medidas de apoyo

Para medir el apoyo o soporte de los grupos se utilizaron los métodos de *Jackknifing* y el soporte de **Bremer**.

El método de *Jackknifing*, introducido en sistemática por Lanyon (1985), se basa en realizar alteraciones de la matriz (mediante re-muestreos al azar sin reemplazo de algunos caracteres), calculando la frecuencia en la que cada grupo se mantiene en los árboles óptimos. Esto da una idea de que proporción de evidencia a favor y en contra hay

para cada grupo y por lo tanto en qué grado la adición de nuevos caracteres puede modificar las conclusiones. Para aplicar este método se realizaron 300 réplicas. Para cada réplica se realizó una búsqueda heurística tradicional con TBR sobre 10 secuencias de adición al azar, reteniendo 10 árboles en cada replicación. La probabilidad de remoción de caracteres fue de $p=0,36$ y los valores se expresaron como frecuencias absolutas.

El **soporte de Bremer** (Bremer, 1994) para análisis usando parsimonia, es una medida que evalúa el número de pasos extras necesarios para perder una rama en el árbol de consenso a partir de los árboles más parsimoniosos de la búsqueda. Una rama presente en uno de los árboles más parsimoniosos está apoyada más fuertemente por los datos si se requiere un gran incremento en la longitud de árboles adicionales antes que esta rama sea perdida en el consenso (Källersjö, 1992). Se aplicó este método realizando una búsqueda heurística con TBR sobre 100 secuencias de adición al azar, reteniendo secuencialmente sub-óptimos hasta 10 pasos de longitud en un total de 10000.

Medidas para evaluar la calidad de los cladogramas

El programa de parsimonia utilizado en este estudio para evaluar la “calidad” de los cladogramas, incluye medidas estándar como la longitud del árbol, el índice de consistencia y el índice de retención.

La longitud es el número mínimo de cambios en los estados de los caracteres (pasos) requeridos en un cladograma para dar cuenta de los datos. El largo del árbol de consenso provee información sobre la existencia de conflicto de caracteres entre (y no dentro) de los cladogramas.

El índice de consistencia (**CI**) (Kluge y Farris, 1969) es una medida de la cantidad de homoplasia presente en una matriz de datos relativa a un cierto árbol.

El índice se calcula como:

$$CI= M / S$$

donde **M**= es número mínimo de pasos que todos los caracteres pueden presentar en cualquier cladograma y **S**= es número mínimo de pasos que pueden exhibir en el árbol en cuestión.

Debido a que este índice se ve incrementado por la presencia de caracteres no informativos, el cálculo se realizó previa inactivación de los mismos.

El índice de retención (**RI**) (Farris, 1989) es la fracción de posible homoplasia retenida como sinapomorfía en el árbol.

Este índice se calcula como:

$$\mathbf{RI} = (\mathbf{G} - \mathbf{S}) / (\mathbf{G} - \mathbf{M})$$

donde **G**= es mayor número de pasos que todos los caracteres pueden exhibir sobre un cladograma (es decir, el peor ajuste).

RESULTADOS

ANÁLISIS MOLECULAR

Caracterización de las secuencias.

La caracterización de las secuencias se muestra en la tabla 1. Se determinó el largo de las mismas y el contenido de guanina-citosina (GC). Los valores determinados se encuentran dentro de los esperados para las secuencias *rpl14* y *trnL* (Wakasugi *et al.* 1998).

La cantidad de pares de bases secuenciadas para el IGS *trnK* resultó menor a lo esperado debido un una mala secuenciación del producto proveniente del *primers* 2R, por lo cual hubo que eliminar una parte de la secuencia (Wakasugi *et al.* 1998).

Tabla 1: Características de las secuencias *rpl14*; IGS *trnK* y IGS *trnL*: largo (pb: pares de bases) y contenido de GC (%).

Secuencias	<i>rpl14</i>		<i>TrnK</i>		<i>trnL</i>	
	Longitud pb	GC %	Longitud pb	GC %	Longitud pb	GC %
<i>F. imbricata</i>	404	36.39	1986	32.88	s/d	s/d
<i>L. linifolia</i>	395	37.47	1991	33.25	s/d	s/d
<i>B. anomala</i>	402	37.06	1989	31.83	s/d	s/d
<i>N. linariaefolia</i>	402	39.55	2003	34.65	698	36.68
<i>N. ericoides</i>	403	38.96	2003	34.25	698	36.53
<i>N. aristata</i>	402	39.55	2003	34.90	698	37.11
<i>N. scoparia</i>	403	38.46	2006	34.25	509	35.36
<i>B. browalloides</i>	403	39.30	2003	34.45	697	36.59
<i>N. veitichii</i>	402	40.30	2002	34.97	698	37.11
<i>N. calycina.</i>	402	39.05	2010	34.13	698	36.68
<i>N. micrantha</i>	402	38.06	2004	34.63	698	36.68

ANÁLISIS FILOGENÉTICO.

rpl14

El análisis de la matriz de datos de *rpl14*, con 28 caracteres informativos, resultó en un único árbol de máxima parsimonia (AMP) de 36 pasos de longitud, CI=0.83 RI=0.86. El grupo de especies del género *Nierembergia* se presentó monofilético (Fig. 4).

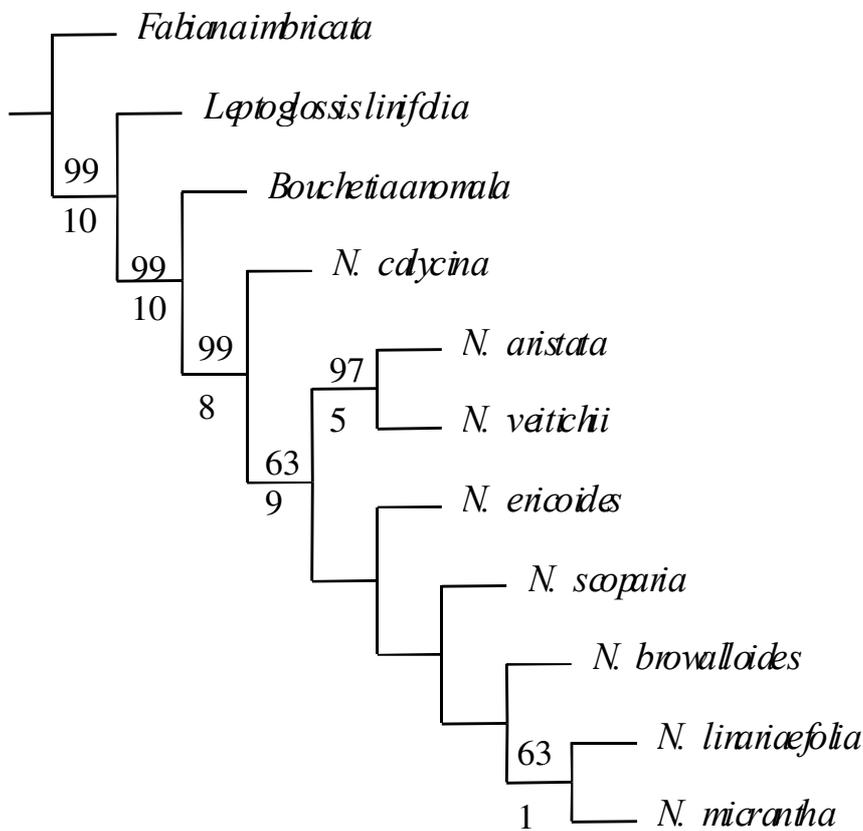


Figura 4: El árbol más parsimonioso obtenido en el análisis de datos de *rpl14*. Los valores de soporte de Jackknife y de Bremer se encuentran sobre y debajo respectivamente de cada uno de los nodos.

Si bien los datos obtenidos en la matriz de secuencias del gen *rpl14* no proveen información suficiente para resolver las relaciones entre todos los taxones, *N. calycina* se presenta separada de las restantes, estas últimas formando un clado con altos valores de soporte -Jackknife (JK)= 99% y Soporte de Bremer (BS)= 8. Dentro de este clado hay un subclado menor con *N. aristata* y *N. veitichii* el que está fuertemente apoyado (JK= 97% y BS= 5) y el cual resulta hermano de un subclado mayor basal con las restantes especies estudiadas (JK= 63% y BS= 9). Dentro de este subclado basal no hay una resolución filogenética con excepción de *N. linariaefolia* y *N. micrantha*, las cuales forman un subclado menor con moderados valores de soporte (JK= 63% y BS= 1) (Fig. 4).

***rpl14* y *trnK* combinados.**

El análisis de la matriz de datos de *rpl14-trnK*, con 474 caracteres informativos, resultó en un AMP de 728 pasos de longitud, CI=0.84 RI= 0.82 (Fig. 4). Se obtuvo una topología diferente con respecto a la obtenida en el árbol anterior (*rpl14*), manteniéndose la monofilia del género *Nierembergia*, con una mayor resolución entre las especies estudiadas.

Si bien la relación entre las especies *N. aristata*; *N. veitichii* y *N. calycina*, no está resuelta de forma semejante a los resultados obtenidos con *rpl14*, las especies restantes se encuentran formando un clado, con altos valores de soporte (JK= 94% y BS= 4). Se destaca el aumento en los valores soportes del subclado encontrado en la topología del árbol anterior (*rpl14*) para los taxones *N. linariaefolia* y *N. micrantha* (JK= 99% y BS= 10). También surge un nuevo subclado formado por *N. ericoides* y *N. scoparia* con valores altos de soporte (JK= 93% y BS= 3).

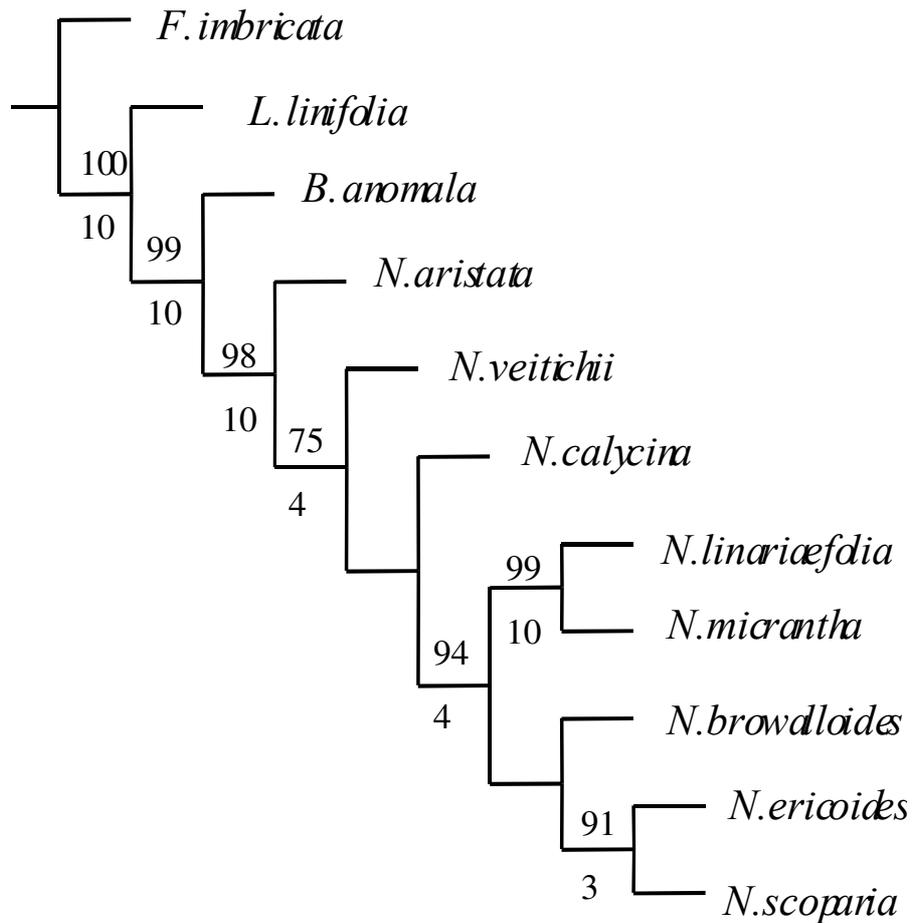


Figura 5: El árbol más parsimonioso obtenido en el análisis de datos del *rpl14* y *trnK*. Los valores de soporte de Jackknife y de Bremer se encuentran sobre y debajo respectivamente de cada nodos.

***rpl14*, *trnK* y *trnL* combinados.**

El análisis de la matriz de datos de *rpl14-trnK-trnL*, con 487 caracteres informativos, resultó en un AMP de 728 pasos de longitud, CI=0.84 RI= 0.82 (Fig. 6). Se obtuvo una topología muy similar a la obtenida en el árbol anterior (*rpl14-trnK*), con un incremento en los valores de soporte de los subclados (Fig.6)

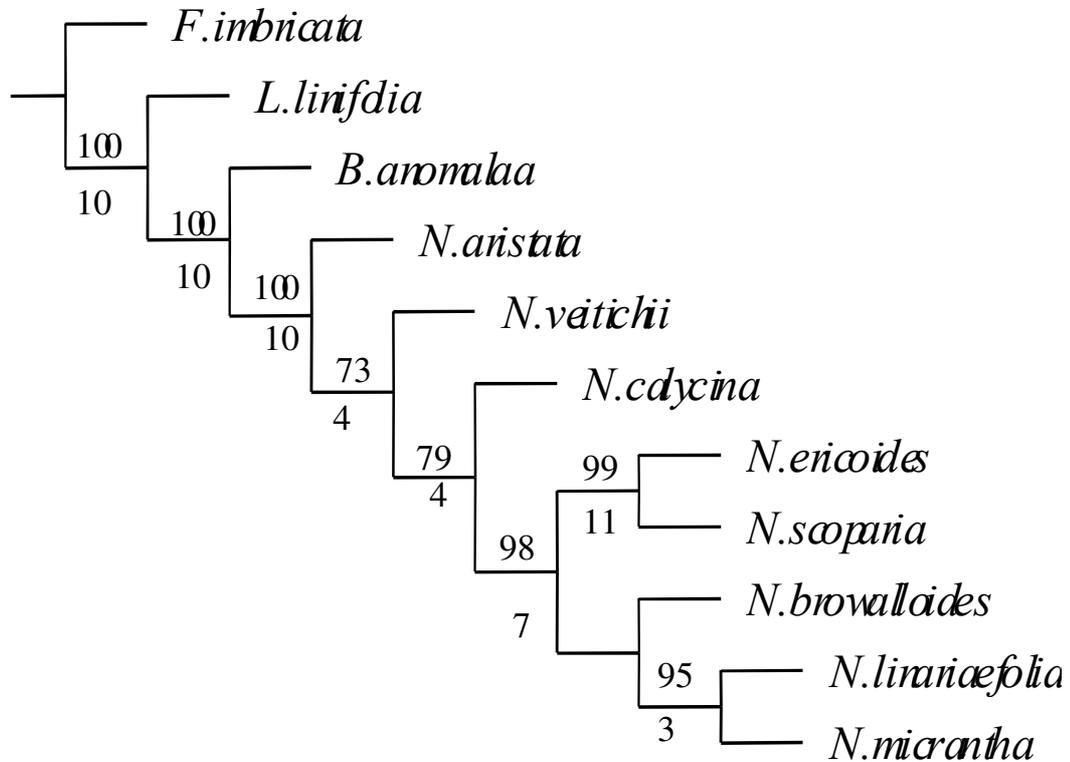


Figura 6: El árbol más parsimonioso obtenido en el análisis de datos del *rpl14*, *trnK* y *trnL*. Los valores de soporte de Jackknife y de Bremer se encuentran sobre y debajo respectivamente de cada nodos.

Si bien la relación filogenética de *N. browalloides* no está resulta completamente en ninguna de las topología descriptas, podemos inferir que dicha especie se encuentra dentro del clado con *N. linariaefolia*, *N. micrantha*, *N. ericoides* y *N. scoparia* con altos valores de soporte en los dos últimos árboles analizados (*rpl14-trnK*: JK= 94% y BS= 4; *rpl14-trnK-trnL*: 98% y BS= 7).

DISCUSIÓN

Todos los árboles filogenéticos obtenidos en este trabajo confirmaron la monofilia de las especies en estudio. Aún más, los valores de los Índices de Consistencia (CI) fueron mayores a 0.80, revelando baja cantidad de homoplasia.

El análisis filogenético propuesto como punto de partida de las investigaciones de esta tesis tenía como objetivos establecer las relaciones filogenéticas entre las especies nativas del género *Nierembergia* de interés ornamental para identificar las especies genéticamente más cercanas y a partir de ellas poder obtener híbridos interespecíficos. Entre los resultados obtenidos, la identificación de las especies que constituyen subclados con altos valores de soporte como los formados por *N. linariaefolia* con *N. micrantha* por un lado y *N. ericoides* con *N. scoparia* por el otro, cubren los objetivos arriba-mencionados. Así, las especies incluidas dentro de cada subclado emergen como padres putativos para la obtención de híbridos interespecíficos, con mayor posibilidad de éxito que cualquier combinación con el resto de las especies. Cabe aclarar que, en la medida que se incorporaban a la matriz de datos mayor número de caracteres, incrementaban aún más los altos valores de soporte encontrados en estos dos subclados.

Estudios filogenéticos realizados en este género por Acosta *et al.* (2006) utilizando el cariotipo como marcador, reportan tres grupos de especies: Un primer grupo incluye *N. browalloides*, *N. calycina*, *N. linariaefolia*, especies que comparten cariotipo similar y número cromosómico $2n=16$. Un segundo grupo involucra a *N. aristata*, *N. veitichii*, ambas especies con el mismo número de cromosomas y afinidad en el cariotipo. Un tercer grupo está integrado por *N. scoparia* y *N. ericoides*, con un número de cromosomas $2n=18$. De acuerdo a Acosta *et al.* (2006), el número cromosómico $2n=18$ constituye un estado derivado de $2n=16$ por un evento de fisión céntrica. En este punto y asumiendo la hipótesis mencionada que explica el origen del número cromosómico $2n=18$, es posible sugerir la

existencia de un clado constituido por dos subclados: el que agrupa a *N. ericoides* y *N. scoparia* por una parte y el formado por *N. linariaefolia*, *N. browalloides* y *N. micrantha*, por la otra.

Comparando el estudio del cariótipo reportados por Acosta *et al.* (2006) con los resultados filogenéticos obtenidos en esta tesis, con los datos moleculares utilizando las secuencias del gen *rpl14* y de los espacios intergénicos (IGS) *trnK* y *trnL*, se comprueba la coincidencia entre ambos. Con respecto a *N. calycina*, si bien en el estudio cariotípico realizado por Acosta *et al.* (2006), aparece dentro del grupo de *N. linariaefolia* y *N. browalloides*, los mismos autores cuestionan su inclusión en este grupo por el hecho de presentar NORs en los brazos largos, sugiriendo que dicha especie es un estado derivado de un ancestro común compartido con *N. linariaefolia* y *N. browalloides* (Acosta *et al.* 2006).

Finalmente, dos resultados aportados por este estudio filogenético merecen ser destacados: (i) el subclado menor formado por *N. veitchii* y *N. aristata* y (ii) la posición de *N. browalloides* dentro del subclado con el resto de las especies que resulta hermano del anterior. Ambos resultados aparecen fuertemente apoyados no sólo por los altos valores de soporte mostrados en este estudio (métodos de Jackknife y de Bremer), sino además por los resultados del estudio sistemático realizado por Acosta *et al.* (2006) sobre datos del cariótipo.

Capítulo II

Estudio de la relación Estigma-Polen/Estilo-Tubo polínico
en cruzamientos interespecíficos entre
especies del género *Nierembergia*

.

INTRODUCCIÓN

La polinización se inicia con la adhesión del polen al estigma (Wheeler *et al.* 2001). Una polinización exitosa requiere polen viable y estigma receptivo, y los métodos para el estudio de ambos aspectos pueden ser directos o indirectos: entre los métodos directos, los más comunes son la polinización controlada en diferentes estados del desarrollo floral y el estudio de la germinación de los granos de polen *in vivo*, es decir, sobre el estigma (Shivanna y Rangaswamy, 1992); entre los indirectos, son comunes la prueba de peróxido de hidrógeno (Galen y Plowright, 1987) para detectar la receptividad del estigma y el uso de tinciones específicas, para detectar viabilidad de polen (Greissl, 1989; Alexandre, 1969).

En los estigmas húmedos, características de *Solanaceae* (Weeler *et al.* 2001), son los exudados los promotores de la adhesión de los granos de polen a la superficie estigmática (Zinkl y Preuss, 2000). Una vez que el polen se ha adherido, se produce la hidratación del mismo para su posterior germinación (Lush *et al.* 1998). La etapa siguiente es la penetración del tubo en el estigma y su crecimiento a lo largo del estilo.

En el caso de los estigmas húmedos la cutícula no ejerce una barrera física a la penetración del tubo polínico, ya que el mismo entra en las papilas estigmáticas, entre la pared y el plasmalema (Facciuto, 2007), o a través de los espacios intercelulares (Shivanna, 2005). Durante la etapa de elongación del tubo polínico se define su dirección de crecimiento, siempre orientada hacia el ovario (Lush *et al.* 2000).

Las interacciones entre el polen y el tejido esporofítico materno, están restringidas a las polinizaciones compatibles. Las Angiospermas han desarrollado diferentes mecanismos a partir de los cuales los granos de polen deseables son discriminados de los no deseables (Wheeler *et al.* 2001). Un mecanismo se da en la incompatibilidad interespecífica, donde el polen es rechazado por la gran disimilitud genética entre la especie dadora y la especie

receptora (Wheeler *et al.* 2001). Otro mecanismo es la incompatibilidad intraespecífica, generalmente referida a la auto-incompatibilidad (SI), donde el polen si bien es originado de la misma especie receptora, es rechazado por la gran similitud debido a su origen en la misma planta o en plantas genéticamente muy cercanas (Clark *et al.* 1990).

Dentro de los sistemas de auto-incompatibilidad encontramos: (i) el gametofítico, donde el fenotipo del polen es específico y responde al propio genotipo haploide y (ii) el esporofítico, donde el fenotipo del polen responde al genotipo diploide de la planta madre (Wheeler *et al.* 2001). Al respecto, la familia *Solanaceae* presenta un sistema de auto-incompatibilidad gametofítica (GSI: Gametophytic Self-Incompatibility), controlado por un único locus multialélico con un alto grado de polimorfismo (Clark *et al.* 1990). En este sistema la fase inicial de la germinación y elongación del tubo, en la mayoría de los casos, es normal produciéndose una inhibición más tardía a lo largo de su recorrido por el estilo (Lush y Clarke, 1997). En *Solanaceae* el locus S codifica para una glicoproteína del pistilo (SLG: style locus glycoprotein), la cual es secretada al espacio extracelular del mismo (Cheung *et al.* 2000). Estudios de plantas transgénicas con pérdida de funcionalidad de estas glicoproteínas, establecieron que su actividad catalítica era crucial en la acción de rechazo de polen incompatible (Lee *et al.* 1994).

El modelo actual sugiere que esta ARNasa degradaría el ARN sólo del polen propio, inhibiendo así su crecimiento. En el polen habría un inhibidor general que no es alélico y que potencialmente podría unirse a las SLG, cualquiera ellas fueran, inactivándolas. La SLG propia no sería inhibida, pues otro componente proteico del polen (alélico y perteneciente al locus S) interaccionaría con su SLG alélica protegiéndola de la inhibición con su consecuente activación y posteriormente degradación del ARN del polen (Sijacic *et al.* 2004).

En cuanto a las interacciones que controlan las barreras interespecíficas, se conoce bastante poco sobre su mecanismo, aunque es lógico pensar que en algunos casos los procesos de reconocimientos podrían ser similares a los que se presentan en las interacciones intraespecíficas (Liedl *et al.* 1994). Asimismo, un mecanismo estudiado en la incompatibilidad interespecífica, es la imposibilidad del polen de hidratarse y nutrirse desde la matriz extracelular del tejido materno (Shivanna y Johri, 1985). En muchos casos, los nutrientes presentes en el polen no son suficientes para generar todas las sustancias necesarias para el crecimiento del tubo hasta los óvulos. En maíz por ejemplo, las reservas del polen alcanzan para el crecimiento del tubo polínico hasta una longitud de apenas 2 cm como máximo, mientras que el mismo debe crecer aproximadamente más de 10 cm (Heslop-Harrison *et al.* 1984).

Considerando que en *Solanaceae* el sistema de auto-incompatibilidad gametofítica se pone de manifiesto a lo largo del estilo (Lush y Clarke, 1997) y también que similares procesos podrían regir la incompatibilidad interespecífica (Liedl *et al.* 1994), en este capítulo se estudió la relación Estigma-Polen/Estilo-Tubo polínico (EPET) en cruzamientos dirigidos entre ocho especies pertenecientes al género *Nierembergia*.

En las especies aquí estudiadas, se tuvieron en cuenta los aspectos mencionados anteriormente. Se identificó el estado de flor joven en la cual el estigma comienza a ser receptivo y al mismo tiempo se detectó la viabilidad del polen. Posteriormente se estudió la compatibilidad interespecífica encontrada en la relación EPET para todas las combinaciones interespecíficas y sus recíprocas.

OBJETIVOS

- Establecer el grado de compatibilidad interespecífica pre-cigótica en ocho especies del género *Nierembergia*, mediante el estudio de la relación Estigma-Polen/Estilo-Tubo polínico.
- En las diferentes especies de *Nierembergia*, detectar la etapa del desarrollo a partir de la cual el estigma es receptivo.
- Determinar si el sistema de incompatibilidad en *Nierembergia* está o no relacionado con la dirección de crecimiento de los tubos polínicos.
- En el género *Nierembergia*, establecer las combinaciones putativamente más exitosas para la obtención de híbridos interespecíficos.

MATERIALES Y METODOS

MATERIAL VEGETAL

Los cruzamientos fueron realizados en plantas adultas de un año, cultivadas bajo condiciones de invernáculo (Anexo I- A) en ocho especies del género *Nierembergia*: *N. aristata* (Cod. IF: **20021119b1**), *N. browalloides* (Cod. IF **20040920g1**), *N. calycina* (Cod. IF **20051214b1**), *N. ericoides* (Cod. IF **20020320b2**), *N. micrantha* (Cod. IF **20041119b1**), *N. linariaefolia* var *linariaefolia* (Cod. IF **20021122c1**), *N. scoparia* (Cod. IF **20051113a1**), *N. veitichii* (Cod. IF **20031118a1**) (Anexo I- B).

METODOLOGÍA

Receptividad de estigma y viabilidad de polen

En todas las especies, con excepción de *N. micrantha*, se seleccionaron los estigmas en dos estados diferentes de desarrollo correspondientes a dos tamaños de pimpollo: (i) el llamado “estado temprano” es el pimpollo con los cuatro verticilos desarrollados pero la corola es incolora; (ii) el llamado “estado avanzado”, es el pimpollo pre-antesis. La tabla 1 muestra los tamaños de los pimpollos para cada especie. En *N. micrantha* por su pequeño tamaño, sólo se pudo trabajar con estigmas correspondientes al mayor tamaño del pimpollo. La receptividad de los estigmas se determinó a través de la prueba de peróxido de hidrógeno (método indirecto) (Galen y Plowright 1987), tomando como receptivos todos los estigmas que presentaron burbujeo. Se realizaron tres repeticiones por especie con cinco estigmas por cada repetición.

Para corroborar la receptividad de estigma y la viabilidad de polen, se hicieron observaciones de polen germinado *in vivo* (método directo), para lo cual se realizaron autopolinizaciones dirigidas. Posteriormente los estigmas fueron fijados en FAA (alcohol

etílico:agua destilada:formol:ácido acético glacial, 10:7:2:1) 5 horas post-polinización (PP). La hidrólisis se realizó en una solución de NaOH 0.6 %, durante 12 horas a temperatura ambiente. La observación de la germinación de granos de polen en estigma se realizó bajo luz UV usando microscopía de fluorescencia (Martin, 1959). Se realizaron seis observaciones por cada tratamiento.

Crecimiento de tubos polínicos en cruzamientos interespecíficos

Durante dos años consecutivos los cruzamientos dirigidos fueron realizados en pimpollos con el mayor grado de desarrollo (Longitud del pimpollo: 2-2.5 cm- *N. linariaefolia*, 1.8-2.2 cm- *N. browaloides*, 2.2-2.6 cm- *N. veitchii*, 1.8-2 cm- *N. scoparia* y *N. aristata*, 5-6 cm- *N. calycina*, 1-1.4 cm- *N. micrantha* y 1.5-2 cm- *N. ericoides*) previo antesis. Los pimpollos fueron polinizados con polen fresco es decir, se aplicó polen proveniente de flores abiertas. La polinización fue realizada durante el mediodía.

Los estigmas fueron fijados en FAA (alcohol etílico:agua destilada:formol:ácido acético glacial, 10:7:2:1) 24 horas PP. Se maceró el tejido con el fin de separar los tubos polínicos del tejido estigmático, utilizando una solución de NaOH 0.6% durante 12 horas a temperatura ambiente. Seguidamente el material fue sumergido en azul de anilina durante 15 minutos y posteriormente montado sobre porta-objetos para su observación bajo luz UV, usando microscopio de fluorescencia (Martin, 1959). Se evaluó el crecimiento de los tubos polínicos en pistilos considerando la distancia recorrida y el porcentaje de tubos. Para ello se dividió el pistilo en tres partes: primer tercio del estilo, segundo tercio del estilo y último tercio del estilo. En cuanto al porcentaje se tomaron tres rangos: 100-80 %, 80-40 % y 40-10 %, considerando el 100 % como la cantidad granos de polen encontrados en estigma. Se evaluaron al menos 10 pistilos en cada uno de los tratamientos (dos años). Los resultados fueron presentados mediante gráficos agrupando los cruzamientos según la

especie tomada como madre y a través de una tabla con todas las combinaciones considerando solo porcentajes de tubos polínicos mayores al 40 % (Pandey, 1962)

RESULTADOS

Receptividad de estigmas y viabilidad de polen

Como muestra la tabla 1, las ocho especies exhibieron respuesta positiva a la aplicación de peróxido de hidrógeno, en los dos estados de desarrollo floral considerados. En todos los casos se detectó un burbujeo que fue evaluado como respuesta positiva de la reacción (Tabla 2). Se observó que los estigmas correspondientes a estados de pimpollo mas avanzados presentaban una mayor presencia de exudado. Los resultados de germinación del polen en el estigma fueron positivos, habiéndose obtenido un 100% de polen germinado en todos los casos (Tabla 3).

Tabla 1: Tamaño de pimpollos evaluados en la receptividad de estigma (cm) en ocho especies de *Nierembergia*. Respuesta positiva al peróxido de hidrógeno asociado al burbujeo.

Especie	Pimpollo “estado temprano”		Pimpollo “estado avanzado”	
	Tamaño ^{*1} (cm)	Receptividad	Tamaño ^{*1} (cm)	Receptividad
<i>N. linariaefolia</i>	1-2	Positiva	2-2.5	Positiva
<i>N. browalloides</i>	0.8-1.8	Positiva	1.8-2.2	Positiva
<i>N. veitichii</i>	1.2-2.2	Positiva	2.2-2.6	Positiva
<i>N. scoparia</i>	0.8-1.8	Positiva	1.8-2	Positiva
<i>N. aristata</i>	1.8-2.8	Positiva	2.8-3.5	Positiva
<i>N. calycina</i>	4-5	Positiva	5-6	Positiva
<i>N. micrantha</i>	* ₂	* ₂	1-1.4	Positiva
<i>N. ericoides</i>	0.5-1.5	Positiva	1.5-2	Positiva

*₁ La longitud de pimpollo se tomo desde la base del mismo hasta el final de la corola extraído de la planta.

*₂ Dato faltante por presentar un solo estado de desarrollo de pimpollo.

Tabla 2: Estigmas receptivos, indicado por el burbujeo en respuesta a la reacción positiva del peróxido de hidrógeno en ocho especies del género *Nierembergia*.

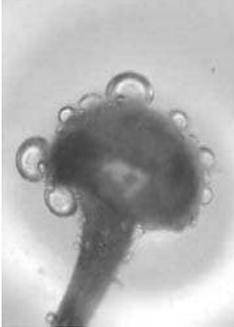
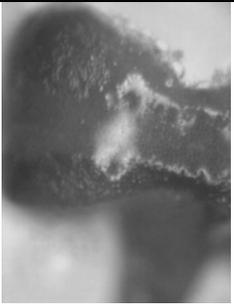
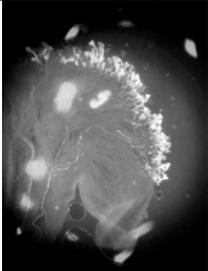
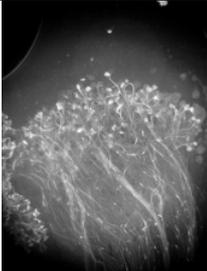
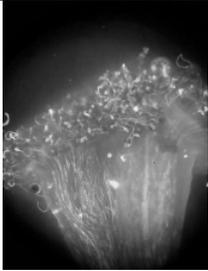
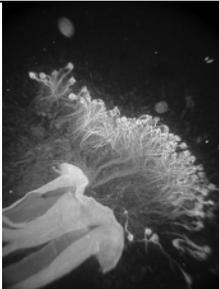
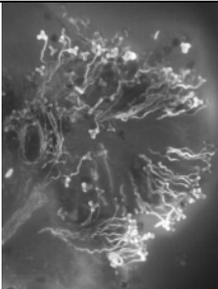
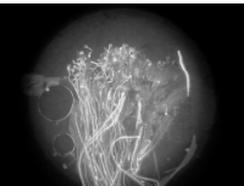
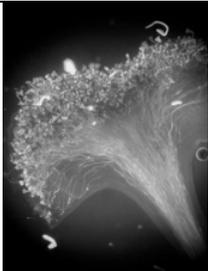
Especie	<i>N. linariaefolia</i>	<i>N. veitichii</i>	<i>N. scoparia</i>	<i>N. browalloides</i>
Estigma receptivo				
Especie	<i>N. aristata</i>	<i>N. calycina</i>	<i>N. micrantha</i>	<i>N. ericoides</i>
Estigma receptivo				

Tabla 3: Germinación de granos de polen en autopolinizaciones, de las ocho especies estudiadas del género *Nierembergia*.

Especie	<i>N. linariaefolia</i>	<i>N. veitichii</i>	<i>N. scoparia</i>	<i>N. browalloides</i>
Estigma receptivo				
Especie	<i>N. aristata</i>	<i>N. calycina</i>	<i>N. micrantha</i>	<i>N. ericoides</i>
Estigma receptivo				

Crecimiento de tubos polínicos en cruzamientos interespecíficos

A continuación se describe el crecimiento del tubo polínico en el pistilo en los cruzamientos interespecíficos y sus recíprocos. Los resultados fueron agrupados por la especie utilizada como madre.

N. aristata (♀): La mayor compatibilidad se observó con *N. veitchii*, donde el crecimiento de tubos polínicos fue normal hasta la base del ovario al igual que la penetración de los mismos en la micrópila de los óvulos (Fig. 1; 2).

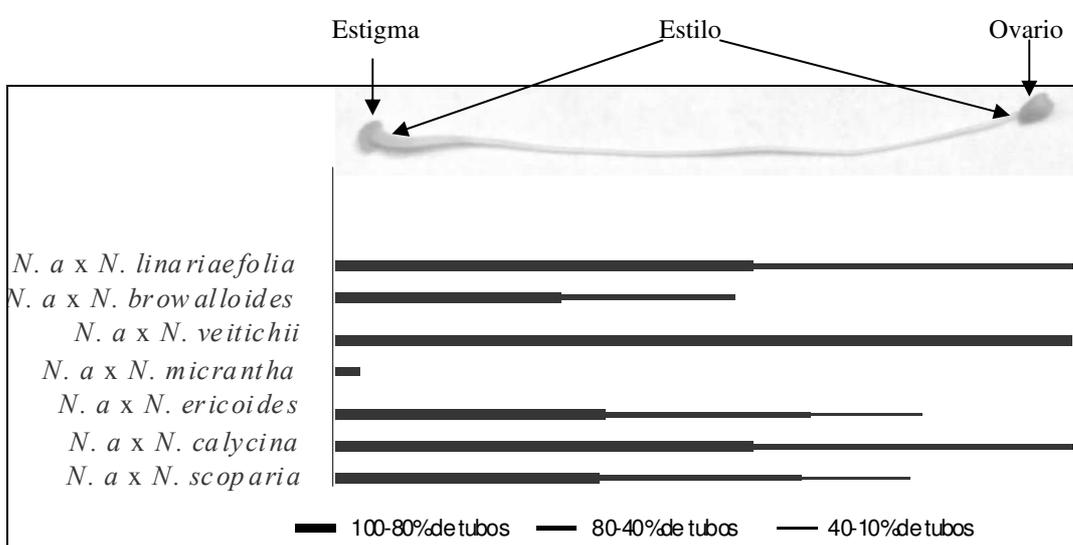


Figura 1: Crecimiento de tubos polínicos sobre pistilo de *N. aristata* en cruzamientos interespecíficos (Datos proveniente del Anexo III- Tabla 1).

Se observó una alta compatibilidad en los cruzamientos de *N. aristata* con *N. calycina* (Fig.1; 2b) y *N. linariaefolia*. En efecto, 50 % de los tubos creció hasta la mitad del estilo y un porcentaje semejante llegó al ovario, y penetró en la micrópila de los óvulos. Con *N. ericoides* y *N. scoparia*, la mayoría de los tubos polínicos interrumpieron su crecimiento a lo largo del estilo (Fig. 1; 2c), llegando al ovario sólo dos o tres tubos. Aún menor compatibilidad presentó el cruzamiento de *N. aristata* con *N. browalloides*, en el cual la mayoría de los tubos polínicos sólo alcanzó la primera parte del estilo, y el resto la mitad del mismo. Finalmente, *N. micrantha* presentó la mayor incompatibilidad con una

germinación anormal de los granos de polen, y ausencia de dirección de crecimiento de los tubos polínicos en el mismo estigma (Fig.1; 2a).

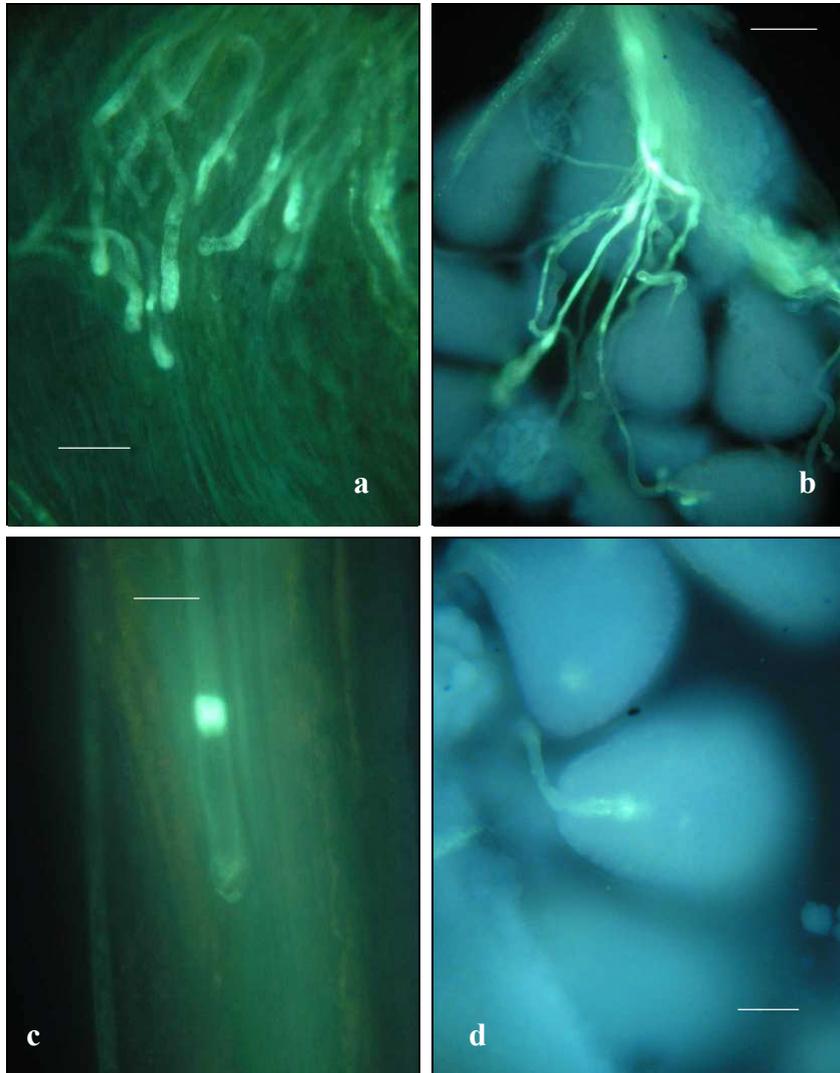


Figura 2. Tubos polínicos en pistilos de *N. aristata* a las 24 horas post polinización. **a-** Tubos polínicos detenidos en el estilo (*N. aristata* x *N. micrantha*). **b-** Tubos polínicos en el ovario (*N. aristata* x *N. calycina*). **c-** Un tubo polínico detenido en el estilo (*N. aristata* x *N. scoparia*). **d-** Un tubo polínico penetrando por la micrópila (*N. aristata* x *N. veitchii*). **Aumento:** barra = 10 μm (**a**); barra = 5 (**b**) μm ; barra=1 μm (**c**) y barra=2 μm (**d**).

N. calycina (♀): En ningún caso fueron observados tubos polínicos en la base del ovario. Se pudo diferenciar grados de compatibilidad de acuerdo a la distancia recorrida por los tubos polínicos a lo largo del estilo (Fig. 3).

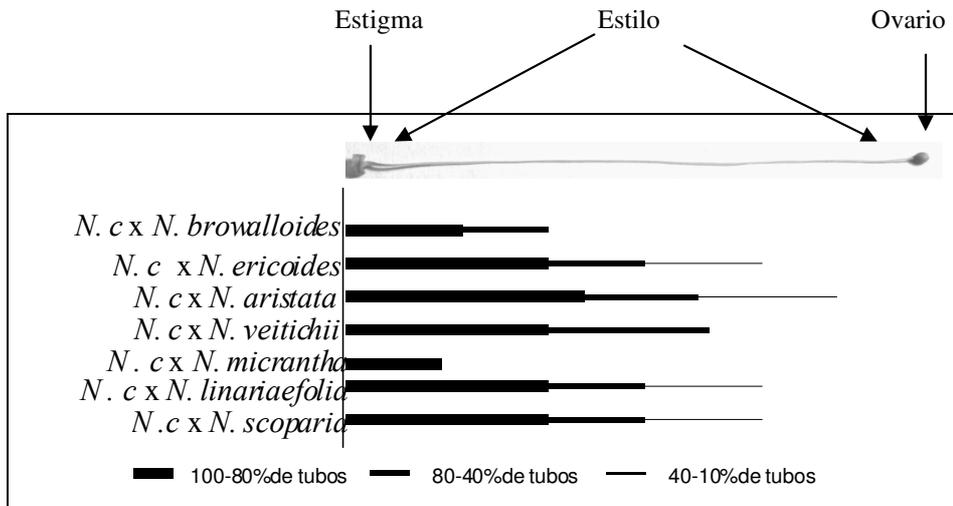


Figura 3: Crecimiento de tubos polínicos sobre pistilo de *N. calycina* en cruzamientos interespecíficos (Datos proveniente del Anexo III-Tabla 2).

En todos los casos la germinación de los granos polen fue normal y la mayoría de los tubos polínicos interrumpió su crecimiento en la mitad del estilo (Fig. 3; 4). El menor crecimiento de tubos polínicos se observó en el cruzamiento de *N. calycina* con *N. micrantha* donde el cese del crecimiento fue completo en la primer parte del estilo (Fig. 4d).

En el cruzamiento de *N. calycina* con *N. scoparia* y *N. ericoides* los tubos polínicos detenidos presentaron un engrosamiento en la punta (Fig. 4a).

En el cruzamiento de *N. calycina* con *N. aristata*, *N. veitichii* y *N. linariaefolia*, las puntas detenidas presentaron un color oscuro, cuando se observan con microscopía de fluorescencia. Su aspecto parece indicar la desintegración de la pared con la liberación del contenido del tubo polínico (Fig. 4b-c).

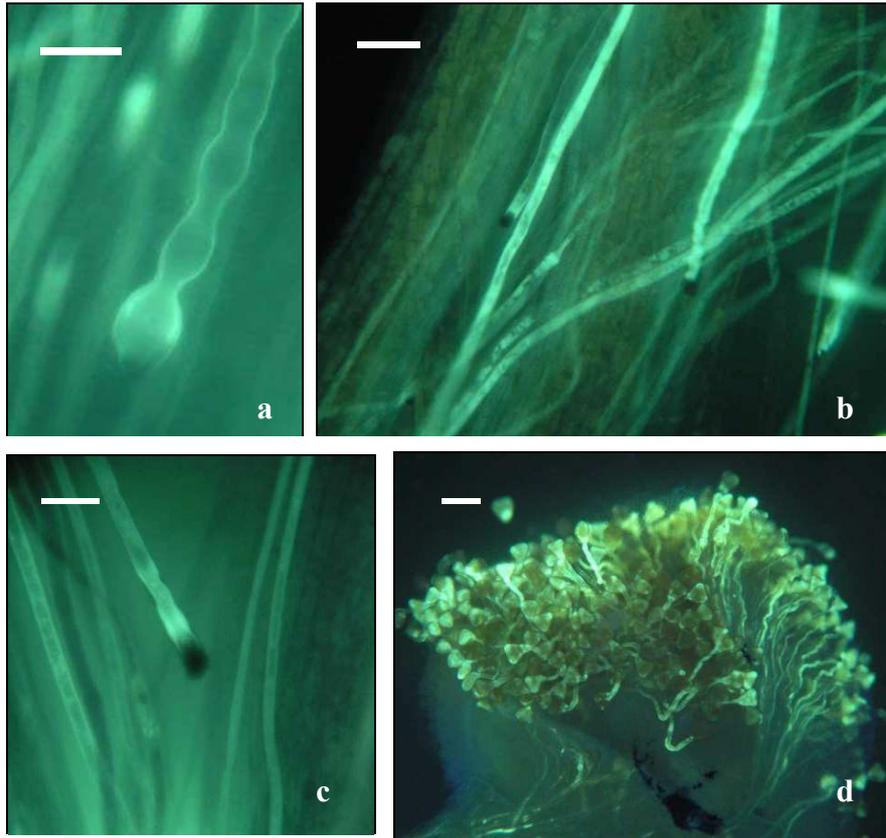


Figura 4. Tubos polínicos en pistilos de *N. calycina* a las 24 horas post polinización. **a-** Tubos polínicos detenidos en el estilo (*N. calycina* x *N. ericoides*) **b-** Tubos polínicos detenidos en el estilo (*N. calycina* x *N. veitichii*) **c-** Tubos polínicos detenidos en el estilo (*N. calycina* x *N. linariaefolia*). **d-** Germinación de polen de *N. micrantha*. **Aumento:** barras=1 μm (**a**, **b**); barra = 2 μm (**b**) y barra=10 μm (**d**).

N. ericoides (E): La mayor compatibilidad se presentó en el cruzamiento de *N. ericoides* con *N. scoparia* y *N. linariaefolia*, donde se observó la llegada de totalidad de los tubos polínicos al ovario con penetración de óvulos en ambos casos (Fig. 5; 6a- b).

Una compatibilidad intermedia se observó en el cruzamientos de *N. ericoides* con *N. veitichii*, *N. aristata* y *N. calycina* (Fig. 5; 7). En estos casos se produjo la interrupción del crecimiento de los tubos polínicos en la mitad del estilo.

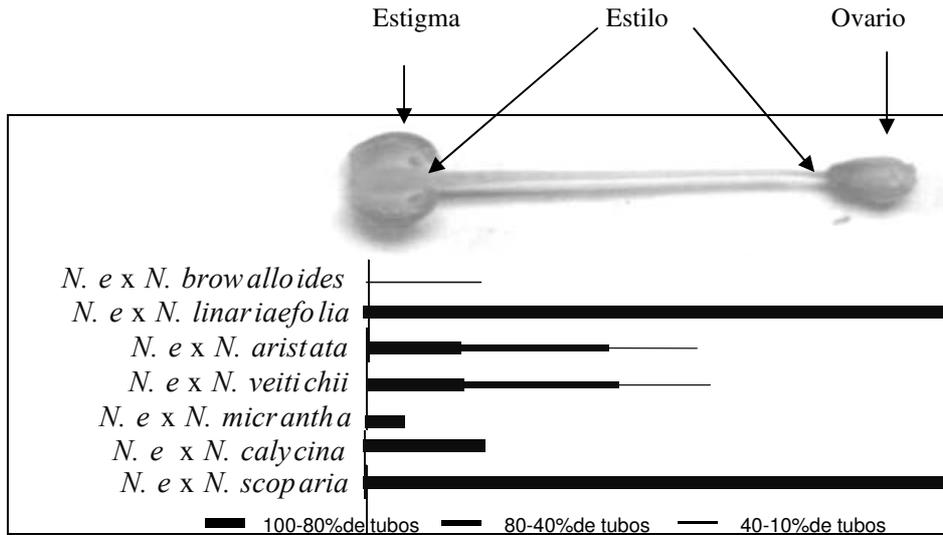


Figura 5: Crecimiento de tubos polínicos sobre pistilo de *N. ericoides* en cruzamientos interespecíficos (Datos proveniente del Anexo III-Tabla 3).

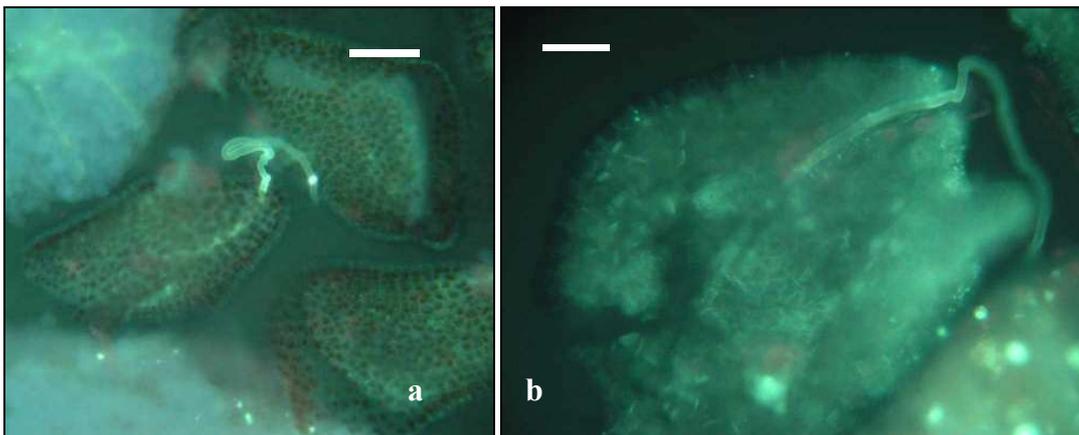


Figura 6. Tubos polínicos en pistilos de *N. ericoides* a las 24 horas post polinización. **a** - Tubo polínico penetrando por la micrópila (*N. ericoides* x *N. linariaefolia*) **b** - Tubo polínico penetrando por la micrópila (*N. ericoides* x *N. scoparia*). **Aumento:** barra = 2 µm (**a**); barra=1 µm (**b**).

El menor crecimiento fue observado en el cruzamiento de *N. ericoides* con *N. micrantha* y la menor germinación de granos de polen se observó en el cruzamiento de *N. ericoides* con *N. browalloides* (Fig. 5). En este último, los tubos polínicos que alcanzaban el ovario mostraban su extremo oscuro y una desintegración semejante a la arriba descrita (Fig. 7a).

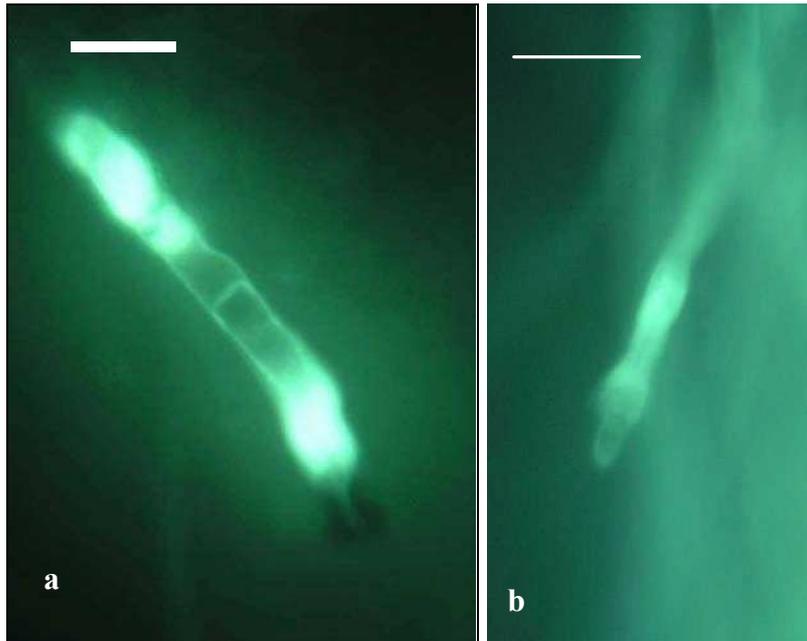


Figura 7. Tubos polínicos en pistilos de *N. ericoides* a las 24 horas post polinización. **a** - Tubo polínico detenido en el estilo (*N. ericoides* x *N. browalloides*) **b** - Tubo polínico detenido en el estilo (*N. ericoides* x *N. calycina*) **Aumento;** barra = 1 µm (**a**); barra=2 µm (**b**).

N. linariaefolia (♀): La mayor compatibilidad se observó en el cruzamiento de *N. linariaefolia* con *N. ericoides* y *N. scoparia* en los que un alto porcentaje de tubos polínicos alcanzó el ovario y penetró en los óvulos por la micrópila (Fig. 8; 9a- b). Menos cantidad de tubos polínicos en el ovario, se detectó en los cruzamientos de *N. linariaefolia* con *N. calycina* (Fig. 8).

En los cruzamientos de *N. linariaefolia* con *N. veitchii* y *N. aristata* (Fig. 8), los tubos polínicos se detuvieron en la mitad del estilo. En el cruzamiento con *N. veitchii*, sólo dos o tres tubos polínicos llegaron a la base del ovario.

La menor compatibilidad se observó en el cruzamiento de *N. linariaefolia* con *N. micrantha*. En este caso, aún cuando el porcentaje de germinación fue alto (Fig. 8), se detectó ausencia total de dirección en el crecimiento de los tubos polínicos en el mismo estigma

N. micrantha (♀): Se observó una alta compatibilidad con todas las especies, presentando en todos los casos buena germinación y un alto porcentaje de tubos polínicos en la base del ovario con penetración en la micrópila de los óvulos (Fig. 10; 11; 12).

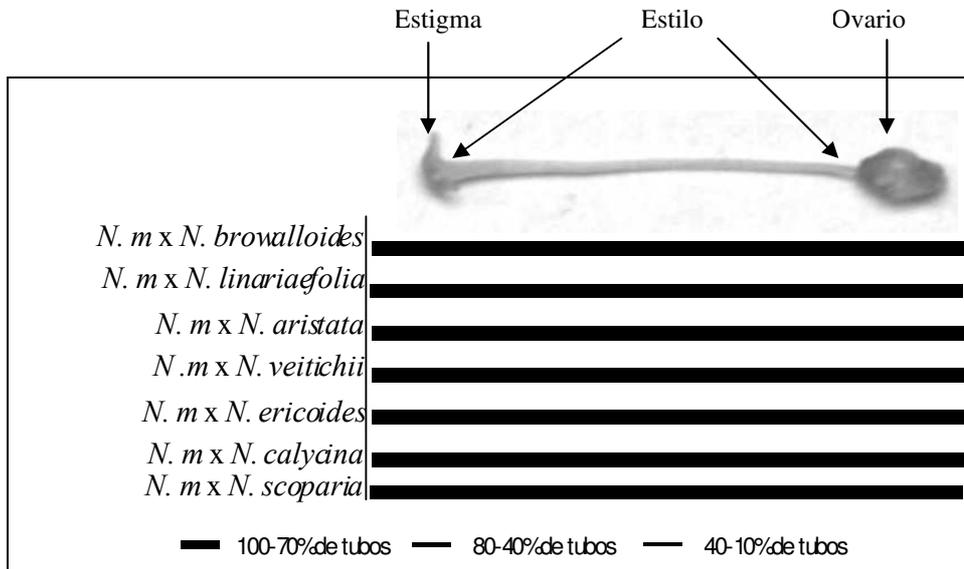


Figura 10: Crecimiento de tubos polínicos sobre pistilo de *N. micrantha* en cruzamientos interespecíficos (Datos proveniente del Anexo III-Tabla5).

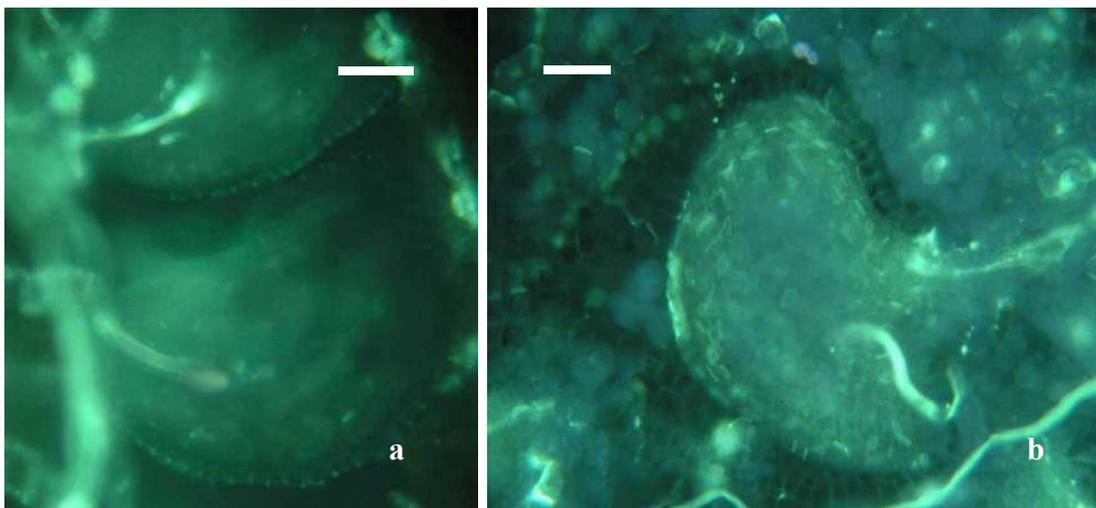


Figura 11. Crecimiento del tubo polínicos en pistilos de *N. micrantha* a las 24 horas post polinización. **a-** Tubo polínico penetrando por la micrópila (*N. micrantha* x *N. linariaefolia*) **b-** Tubo polínico penetrando por la micrópila (*N. micrantha* –autofecundación-) **Aumento.** barra= 2 μ m (**a**), barra=10 μ m (**b**)

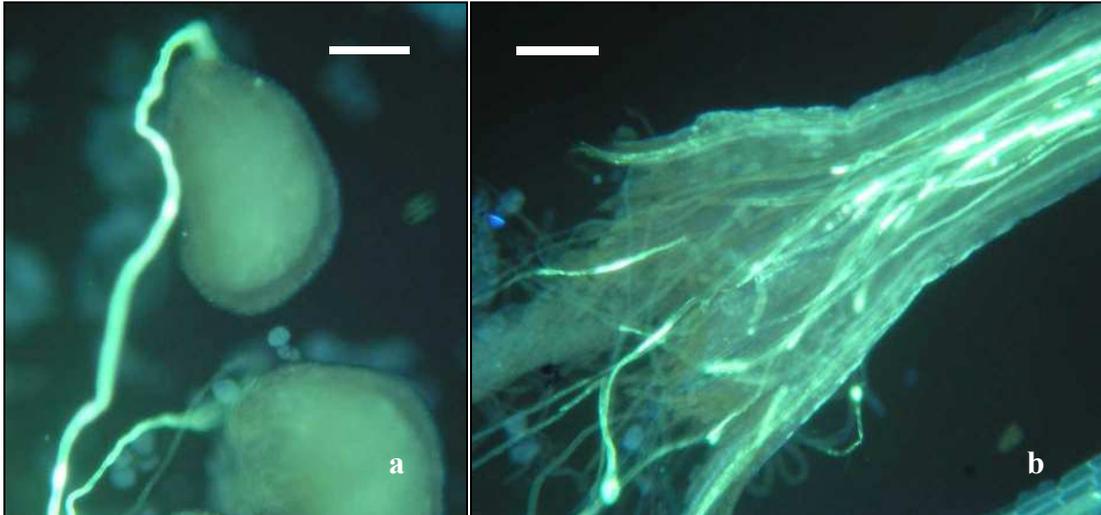


Figura 12. Crecimiento del tubo polínico en pistilos de *N. micrantha* a las 24 horas post polinización. **a-** Tubo polínico penetrando por la micrópila (*N. micrantha* x *N. scoparia*). **b-** Tubos detenidos en la base del ovario (*N. micrantha* x *N. browaloides*). **Aumento:** barra = 5 μm (**a**); barra= 2 μm (**b**).

N. scoparia (♀): La mayor compatibilidad se observó en los cruzamientos de *N. scoparia* con *N. ericoides* y *N. linariaefolia*, siendo alto el porcentaje de tubos polínicos que alcanzan el ovario y penetran en los óvulos (Fig. 13; 14).

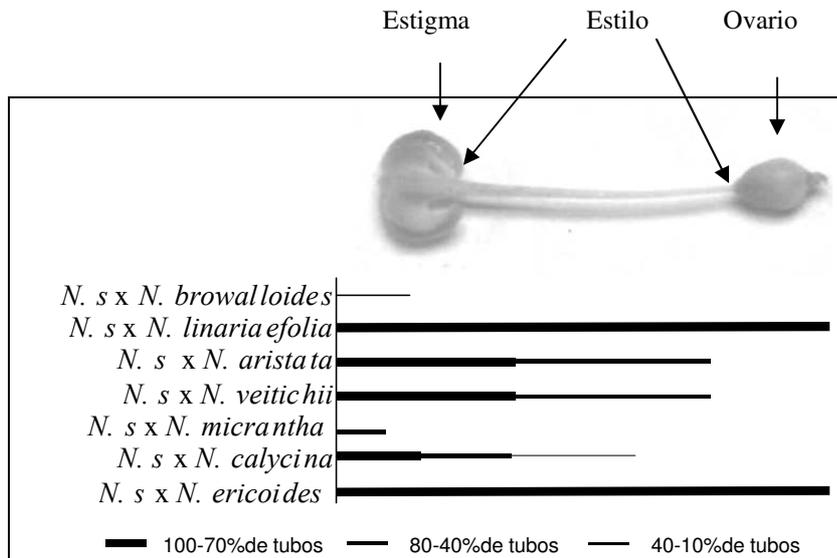


Figura 13: Crecimiento de tubos polínicos sobre pistilo de *N. scoparia* en cruzamientos interespecíficos (Datos proveniente del Anexo III- Tabla 6).

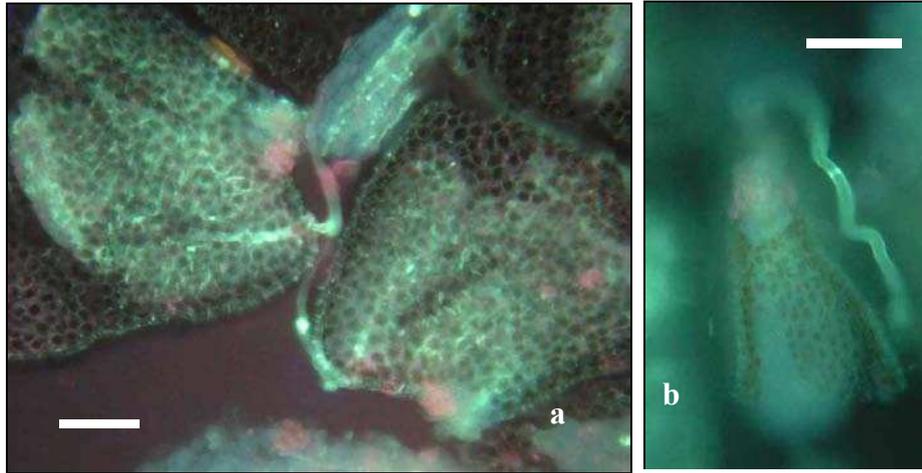


Figura 14. Crecimiento del tubo polínico en pistilos de *N. scoparia* a las 24 horas post polinización. **a-** Tubo polínico penetrando por la micrópila (*N. scoparia* x *N. ericoides*). **c-** Tubo polínico penetrando por la micrópila (*N. scoparia* x *N. linariaefolia*). **Aumento:** barra = 2 (a) µm; barra = 5 µm (b).

En los cruzamientos de *N. scoparia* con *N. aristata*, *N. veitchii* y *N. calycina* los tubos polínicos interrumpieron su crecimiento en la mitad del estilo. La menor compatibilidad se observó en los cruzamientos con *N. micrantha* y *N. browalloides*, en los cuales, la mayoría de los tubos polínicos interrumpieron su crecimiento en la primera porción del estilo.

N. veitchii (♀): La mayor compatibilidad se presentó en los cruzamientos con *N. aristata*, donde la totalidad de los tubos polínicos alcanzó la base del ovario (Fig. 15; 16a).

Un menor porcentaje de tubos polínicos en ovario se detectó en los cruzamientos de *N. veitchii* con *N. scoparia*, *N. ericoides* y *N. calycina* (Fig. 15; 16b), pero en todos los casos se observó penetración de los tubos polínicos en los óvulos. Baja compatibilidad se presentó en el cruzamiento de *N. veitchii* con *N. micrantha*, en el cual los tubos polínicos detuvieron su crecimiento en la primera parte del estilo.

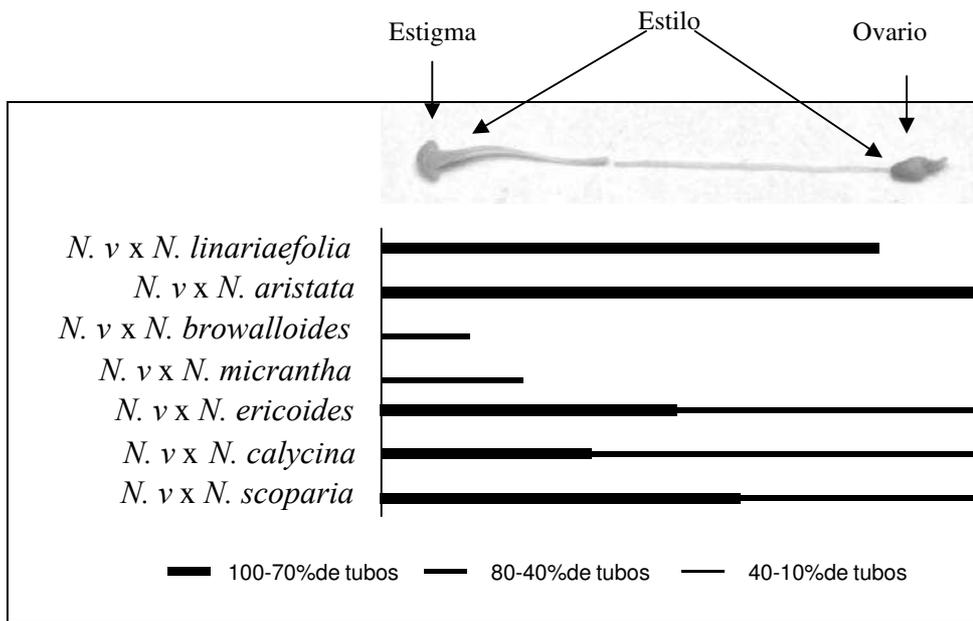


Figura 15: Crecimiento de tubos polínicos sobre pistilo de *N. veitchii* en cruzamientos interespecíficos (Datos proveniente del Anexo III- tabla7).

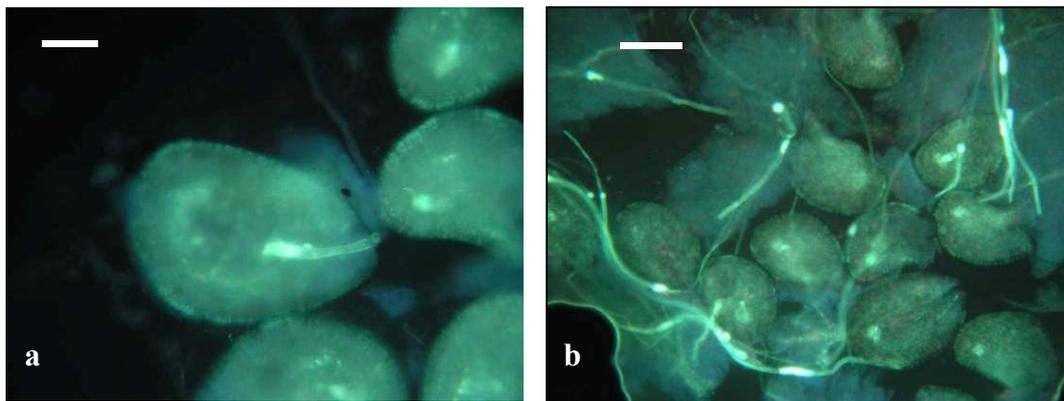


Fig. 16. Crecimiento del tubo polínico en pistilos de *N. veitchii* a las 24 horas post polinización. **a-** Tubo polínico penetrando por la micrópila (*N. veitchii* x *N. aristata*). **b-** Tubo polínico en ovario (*N. veitchii* x *N. scoparia*). **Aumento:** barra= 2 μm (a); barra = 5 μm (b).

N. browalloides (♀): La mayor compatibilidad se presentó en el cruzamiento de *N. browalloides* con *N. calycina*, *N. scoparia*, *N. ericoides* y *N. linariaefolia*. En todos ellos la totalidad de los tubos polínicos alcanzó el ovario (Fig. 17).

En los cruzamientos con *N. aristata* y *N. veitchii*, la germinación de los granos de polen fue normal, aunque los tubos polínicos interrumpieron completamente su

Tabla 4: Patrones de compatibilidad a nivel estigma-estilo en cruzamientos interespecíficos.

		E							
		N.a	N.v	N.c	N.e	N.s	N.l	N.m	Nb
♀	N.a	--	○	◐	◑	◒	◓	○	◑
	N.v	○	--	◐	◑	◒	◓	○	◑
	N.c	○	○	--	◑	◒	◓	○	○
	N.e	◑	○	◐	--	○	○	○	○
	N.s	◑	○	◐	○	--	○	○	○
	N.l	○	○	◐	○	○	--	○	○
	N.m	◑	◑	◑	◑	◑	◑	--	◑
	N.b	◑	◑	◑	◑	◑	○	○	--

- > 40% de tubos polínicos presentes en ovario.
- ◓ > 40% de tubos polínicos presentes en el último tercio del estilo.
- ◒ > 40% de tubos polínicos presentes en el segundo tercio del estilo.
- ◑ > 40% de tubos polínicos presentes en el primer tercio del estilo.
- ◐ ausencia de dirección de crecimiento de los tubos polínicos en estigma

DISCUSIÓN

Teniendo en cuenta que el modelo de auto-incompatibilidad gametofítica propone que la incompatibilidad se expresa en el nivel del estilo (Nettancourt, 2005; Pandey, 1969) y asumiendo que procesos semejantes pudieran regir la incompatibilidad interespecífica (Liedl *et al.* 1994), se analizó con éxito la relación EPET en el género *Nierembergia*. En este sentido, los estudios realizados en *Nierembergia* se apoyaron en lo que se conoce en *Solanum spegazzini* Bitt. (Erazzú, 1999), especie en la que se demuestra que la auto-incompatibilidad se manifiesta por la inhibición del crecimiento del tubo polínico, en diferentes niveles del estilo.

La germinación de granos de polen en estigmas inmaduros, mostró que la presencia de exudado conspicuo no es necesaria para la germinación del mismo ya que, en todas las especies estudiadas (*N. linariaefolia*, *N. aristata*, *N. veitichii*, *N. scoparia*, *N. ericoides*, *N. browalloides*, *N. micrantha* y *N. calycina*) la germinación de los granos de polen en los estigmas jóvenes fue exitosa. Esto ya había sido detectado en *Petunia*, otro género de *Solanaceae*, en el que Shivanna (2005) demuestran que el porcentaje de germinación de granos de polen en los estigmas jóvenes (con escaso exudado) es igual al de los estigmas maduros (con abundante exudado) (Lush *et al.*, 1998).

Shivana y Sastri (1981) detectan en los estigmas húmedos de flores muy jóvenes de *Petunia* híbrida y *Nicotiana tabacum* una fina película, vinculada a la receptividad estigmática. Estos autores consideran que se trata de una sustancia de naturaleza diferente a la del exudado, y que la germinación de granos de polen en estado juvenil se produce sin presencia de exudado. Su comportamiento sería semejante de los estigmas secos (Shivanna y Ram, 2005). Otros estudios realizados en *Lilium* por Ghosh y Shivanna (1984) proponen que la ausencia de exudados establece la primera barrera de incompatibilidad, y que esta barrera es pasiva, estando vinculada solamente a la adhesión y no a la germinación de los

granos de polen. En las especies de *Nierembergia* aquí estudiadas no se detecta esta película pero es posible que la misma exista y pueda ser observada como una delgada capa por encima de la cutícula, sólo visible con microscopía electrónica de transmisión. Este es un tema que será investigado en el futuro próximo.

Con respecto al crecimiento del tubo polínico, específicamente con respecto a la dirección de su crecimiento, se observó que éstos nunca se desviaban, dirigiéndose siempre hacia la base del ovario. Este comportamiento permite asumir que el sistema de incompatibilidad no estaría involucrado con la dirección del crecimiento de los tubos polínicos en el estilo. Uno de los modelos que explican la conservación de la dirección de crecimiento se basa en la estructura del tejido de transmisión que se encuentra en los estilos sólidos, tipo de estilo que caracteriza a la familia *Solanaceae* (Lush *et al.* 2000). Otro modelo alternativo o complementario, se constituye sobre la base de aspectos bioquímicos, encontrados en la matriz extracelular del tejido materno en contacto con el tubo polínico, donde un gradiente diferencial de glicosilación de los niveles de proteínas específicas, estarían involucrados en la dirección del crecimiento (Cheung *et al.* 2000; Cheung *et al.* 1995; Cheung, 1995; Wu *et al.*, 1995 Wang *et al.*, 1993;). Ambos modelos sustentan la hipótesis propuesta en este trabajo, la cual considera que en *Nierembergia* la dirección de crecimiento está a cargo solamente del tejido esporofítico, y por lo tanto no puede ser relacionada con los mecanismos de incompatibilidad.

Los cruzamientos interespecíficos entre las especies de cada uno de los subclados establecidos en el capítulo I de esta tesis resultaron compatibles, con una excepción: es el caso de *N. micrantha* cuando es utilizada como padre. Esta última presenta una longitud del estilo marcadamente menor en comparación con el resto de las especies estudiadas. Teniendo en cuenta esta diferencia propongo como hipótesis que los tubos polínicos proveniente de especies con estilos-cortos no pueden recorrer los estilos de especies con

estilos-largos y la causa es una carencia nutricional. Dichos resultados pueden estar relacionados con una incompatibilidad interespecífica dada por el agotamiento de reservas del grano de polen, el cual estaría adaptado para germinar en un estilo de menor longitud (Kho y Baër, 1973). Estudios presentados por Aguilar *et al.* (2002), demuestran una correlación positiva entre el tamaño del polen y el largo del estilo en la tribu *Lycieae* Hunz (*Solanaceae*). Dicha correlación es interpretada por Baker y Baker (1982) como una relación funcional entre la reserva de energía del grano de polen y la distancia estigma-óvulo. En general, el crecimiento del tubo polínico está condicionado por los componentes del grano del polen y por procesos físico-químicos envueltos en la relación estigma-estilo-tubo polínico (Williams *et al.* 1982). El grano de polen puede contener carbohidratos, lípidos, proteínas (de reserva y enzimas) y amino-ácidos, todos esenciales para el crecimiento del tubo polínico; sin embargo muchos de estos componentes no son sintetizados durante el crecimiento, y necesitan ser absorbidos desde el estilo, siempre y cuando se reconozcan los ARNm específicos para dichas funciones (Torres, 2002).

Tal como propone Torres (2002) en géneros pertenecientes a la familia *Asteraceae*, el crecimiento del tubo polínico en *Nierembergia* podría estar asociado al soporte nutricional del mismo por parte del estilo, bajo el control de un mecanismo específico relacionado con cada especie. Si así fuera, esto constituye entonces una barrera de incompatibilidad interespecífica. Este tema amerita futuros estudios.

En los cruzamientos interespecíficos, donde fueron utilizadas como madres las especies *N. calycina* y *N. ericoides*, se observó una interrupción en el crecimiento de los tubos polínicos que fue acompañada por un engrosamiento de calosa en la punta del mismo, terminando en algunos casos con una aparente ruptura. Este fenómeno fue citado en *Lycopersicon peruvianum* Mill. por Nettancourt *et al.* (1974) y en otros sistemas donde la acumulación de calosa provoca un estallido en la punta del tubo polínico con la

consecuente liberación de las gametas en forma prematura, presentándose como otro mecanismo involucrado en el sistema de incompatibilidad gametofítica (Dumas y Knox, 1983). Este hecho es también descrito por Williams *et al.* (1982) en cruzamientos interespecíficos en *Rhododendron*.

Finalmente se puede concluir que los cruzamientos interespecíficos entre las especies pertenecientes a los mismos sub-clados establecidos en el capítulo I (*N. aristata* - *N. veitchii*; *N. scoparia* - *N. ericoides*, y *N. linariaefolia* - *N. micrantha*) constutiyen los cruzamientos putativamente más exitosos para la obtención de híbridos con excepción de aquel que presenta a *N. micrantha* como padre. Sin embargo, la obtención de híbridos entre especies pertenecientes a un mismo clado, también podría ser posible con la aplicación de técnicas de mejoramiento que permitan sortear posibles barreras de incompatibilidad. La técnica conocida como rescate embrionario es una de ellas (Dinu *et al.* 2005).

Capítulo III

Embriogénesis y endospermogénesis en hibridación Interespecífica entre *N. linariaefolia*, *N. scoparia* y *N. ericoides*.

INTRODUCCIÓN

Las barreras que limitan los métodos sexuales de reproducción en algunos casos han sido identificadas primero y sorteadas después produciendo variaciones genéticas y eventualmente germoplasma mejorado (Dinu *et al.* 2005).

El conocimiento previo de la naturaleza de las barreras de incompatibilidad es lo que permite seleccionar o desarrollar diferentes métodos para sortearlas. Entre los métodos utilizados pueden mencionarse como ejemplos la polinización en estado temprano de pimpollo, el uso de diferentes formas de polinización, el injerto de estilo (Van Tuyl y Jeu, 2005).

Las barreras de incompatibilidad se establecen antes o después de la polinización. A su vez, las barreras postpolinización pueden constituirse antes o después de la fecundación. Entre las barreras de postfecundación la más común es el aborto del embrión híbrido en diferentes estados de desarrollo (Shivanna, 2005). Los factores involucrados que han sido identificados son varios, entre ellos, presencia de genes letales, desarmonía genética en el embrión o fracaso del desarrollo del endosperma en etapas tempranas (Shivanna, 2005).

En cuanto a las barreras de prefecundación, Shivanna (2005) las clasifica considerando el lugar del gineceo en donde se ejerce la incompatibilidad: (i) en la superficie del estigma; (ii) en el estilo; (iii) en el ovario/óvulo.

En *Solanaceae* se han identificado barreras que incluyen esterilidad masculina núcleo-citoplasmática (Shifriss, 1997), poliploidía (Thompson y Lumaret, 1992), interacción estilo-tubo polínico (de Nettancourt, 2005) e interrupción del desarrollo del

endosperma (Friedman, 1998), lo que probablemente resulte en el aislamiento reproductivo de las especies de *Solanum* (Hanneman, 1999).

Con respecto al endosperma, existen estudios que demuestran su rol esencial en el desarrollo de la semilla, tanto en la nutrición del embrión como fuente de señales requeridas en la embriogénesis (Brink y Cooper, 1947; Berger 1999). La interrupción del desarrollo del endosperma ha sido señalada en el género *Solanum* de la sección *Petota*, como mecanismo preventivo en la hibridación entre especies, las cuales están aisladas desde el punto de vista reproductivo (Johnston y Hanneman, 1982).

Teniendo en cuenta los cruzamientos entre plantas con diferentes niveles de ploidía, varias hipótesis han sido propuestas para explicar la interrupción en el desarrollo del endosperma que se produce cuando los cruzamientos resultan incompatibles. La relación genómica materna:paterna 2:1 en el endosperma, ha sido considerada una condición necesaria para el éxito en el desarrollo del endosperma tanto en cruzamientos intraespecíficos como interespecíficos (Quarin, 1999). Aunque todos los casos de cruzamientos intraespecíficos con diferentes niveles de ploidía se ajustan a esta propuesta, no sucede igual con los cruzamientos interespecíficos. Una causa aparente es la intervención de genes específicos en el desarrollo del endosperma de los híbridos, los que pueden tener diferentes valores o “fuerzas” según las especies, sin tener en cuenta el nivel de ploidía (Masuelli y Camadro, 1997). De acuerdo a Johnston *et al* (1980), para cada especie existe un número efectivo, esto es; el Balance del Número Endospermico (BNE), el cual no tiene que tener necesariamente una relación directa con el nivel de ploidía.

Es importante destacar que los estudios de embriogénesis y/o endospermogénesis en cruzamientos interespecíficos, puede ayudar a explicar el papel que juega dentro de las barreras de incompatibilidad, el complejo sistema del BNE en niveles pre y post-cigóticos (Masuelli y Camadro, 1997). Estos estudios también proporcionan información valiosa

para la aplicación precisa de técnicas de rescate embrionario, las cuales posibilitan el aislamiento de embriones o la transferencia de los mismos a un medio nutritivo específico para su crecimiento y diferenciación *in vitro* antes que la semilla colapse (Jhon y Cooper, 1958). Las técnicas de cultivo *in vitro* aplicadas al mejoramiento son utilizadas para sortear barreras postfecundación causadas por la interrupción en el desarrollo del endosperma o el aborto del embrión (Van Tuyl y Jeu 1997).

El rescate embrionario, como metodología para la obtención de híbridos, ha sido utilizado exitosamente en muchos cultivos, siendo *Lilium* el género modelo en las técnicas de manipulación de estilo y de cultivo *in vitro* (Van Tuyl y Jeu, 2005). Otros ejemplos en los cuales se haya empleado el rescate embrionario para la obtención de híbridos interespecíficos, se encuentran en los géneros *Allium* L., *Lycopersicum*, *Solanum*, *Alstroemeria* L., *Datura* L. (Van Tuyl y Jeu 2005). También su utilización se extiende a híbridos intergenéricos, como los obtenidos entre los géneros *Sinapis* L. y *Brassica* L. El rescate embrionario presenta dos puntos a tener en cuenta, el primero es el aislamiento del embrión, y aquí se debe considerar el estado del mismo y la metodología utilizada. El segundo punto es el medio óptimo en el cual debe desarrollarse el embrión para asegurar el crecimiento y la diferenciación (Van Tuyl y Jeu, 2005).

Embriología de la familia *Solanaceae*.

De acuerdo a Johri *et al.* (1992) los géneros estudiados hasta el momento en la familia *Solanaceae* presentan en común las siguientes características embriológicas: el óvulo es hemianátropo, anátropo o campilótropo, unitegumentado y tenuinucelar. El endotelio generalmente se diferencia en el estado 2-nuclear del saco embrionario, encontrando variaciones como: ausencia de este tejido en *N. tabacum* y presencia prominente en *Capsicum* (Johri *et al.* 1992). En la nucela se diferencia una única

arquéspora o varias. Una única célula funciona como célula madre de las megásporas, la cual por meiosis produce una tétrada linear o en forma de “T”. La megáspora calazal genera un gametofito de tipo *Polygonum*, es decir monospórico, 7-célular, 8-nucleado en la mayoría de los casos pero en *Capsicum frutescens* var. tabaco L. H. Bailey, *C. nigrum* Willd. y *C. pendulum* Willd. el saco embrionario es de tipo *Allium*, es decir bispórico 7-célular, 8-nucleado Las sinérgidas alargadas y las antípodas son efímeras (Johri *et al.* 1992).

En el género *Solanum* la fecundación ocurre entre 24 y 48 h posterior a la polinización. La primera división del núcleo endospermogénico se produce 48 h PP (posterior a la polinización) y la división del cigoto ocurre aproximadamente con el endosperma de 40-células (Johri *et al.* 1992).

Los tres tipos de desarrollo de endosperma reportados en *Solanaceae* por Johri *et al.* (1992) son: el tipo Celular, el cual se presenta como el más común, el tipo Nuclear que ocurre en *Salpiglossis picta* Sweet, *Scopolia atropoides* Bercht. & J. Presl y *Schizanthus pinnatus* Ruiz & Pav. y el tipo Intermedio que se reporta en *Hyoscyamus orientalis* M. Bieb.

El desarrollo del embrión corresponde al tipo *Solanaceae* en *Sclerophylax caducifructus* Di Fulvio, y de tipo *Onagraceae* en *Capsicum annuum* L. (Johri *et al.* 1992).

OBJETIVOS

- Corroborar la cercanía filogenética reportada en el capítulo I de esta tesis, con la obtención de desarrollos normales de embrión y endosperma.

- En cada cruzamiento incompatible, detectar el estado de desarrollo del endosperma y del embrión en el que se expresa la incompatibilidad para aplicar técnicas de rescate de embriones.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIAL VEGETAL

Flores de *N. linariaefolia* (Cod. IF: **19990112-26**), *N. ericoides* (Cod. IF: **20020320b2**), y a *N. scoparia* (Cod. IF: **20051213a1**) (Anexo I- B).

Ovarios de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 y 13 días post-polinización (DPP) provenientes de cruzamientos interespecíficos dirigidos.

METODOLOGÍA.

Cruzamiento y fijación del material

Los cruzamientos dirigidos fueron efectuados en estado de pimpollo. La emasculación fue realizada previa polinización; los pimpollos fueron abiertos con una pinza, extrayendo las anteras conjuntamente con la corola e inmediatamente fue depositado sobre el estigma polen fresco. La polinización artificial fue realizada en todos los casos en el período de diciembre a marzo, durante dos años consecutivos.

Preparación del material para microscopía

Los ovarios fueron fijados en glutaraldehído 2.5 % en buffer fosfato pH 7.2 a 4 °C, posteriormente deshidratado en una serie de alcohol etílico/xilol y embebido en parafina (O' Brien, 1981). Se realizaron cortes seriados de 8-10 µm, utilizando un micrótopo rotativo (tipo Minot) y cuchillas descartables (PATHO CUTTER II, 35°/80mm). Las secciones fueron coloreadas con safranina-verde indeleble (fast green) y montados sobre un medio sólido (Bálsamo de Canadá sintético -Biopack) con un índice de refracción tde 1.54. Las secciones fueron analizadas usando microscopía de campo claro (Olympus) y las fotografías fueron tomadas con una cámara digital Olympus C- 5060 .

RESULTADOS

Los cruzamientos interespecíficos realizados entre tres especies de *Nierembergia*, dieron como resultado dos combinaciones compatibles (Fig. 1; 2) y cuatro no compatibles (Fig. 3-6). A continuación se describe la fecundación, la endospermogénesis, la embriogénesis y el desarrollo del endotelio en cada uno de estos cruzamientos.

DESARROLLO EMBRIONARIO EN CRUZAMIENTOS INTERESPECÍFICOS COMPATIBLES

N. ericoides x *N. scoparia* (*Ne* x *Ns*) y *N. scoparia* x *N. ericoides* (*Ns* x *Ne*)

Fecundación

En las combinaciones *Ne* x *Ns* (*N. ericoides* x *N. scoparia*) y *Ns* x *Ne* (*N. scoparia* x *N. ericoides*) se observó que el porcentaje de la fecundación fue 100 %.

En el momento de llegada del tubo polínico a la micrópila se observó que el saco embrionario está totalmente desarrollado. La doble fecundación se produce 2 DPP (días posteriores a la polinización) en ambos cruzamientos, sin diferencias entre ellos. En este proceso, se visualizó que el tubo polínico descarga su contenido en una de las sinérgidas a través del aparato filar. La sinérgida receptora del contenido del tubo polínico, se diferencia de la otra a partir del momento mismo de la descarga. La sinérgida penetrada se presenta fuertemente coloreada, resultando difícil diferenciar núcleos o vacuolas. La otra sinérgida exhibe claramente su núcleo en posición calazal y su vacuola, micropilar (Fig. 1a; 2a).

Endospermogénesis

A partir del día 3 PP se iniciaron las divisiones que dan origen al endosperma. A cada división de núcleo le sigue la citocinesis, por lo que el endosperma corresponde al

tipo celular (Fig. 1d; 2c). Las células en las primeras divisiones se muestran altamente vacuolizadas. El día 9 PP terminan la fase de divisiones celulares y se inicia la fase de acumulación de reservas; en esta etapa las vacuolas se cargan de proteínas y se fragmentan en cuerpos proteicos, por lo que la síntesis de proteínas en esta etapa es muy activa (Fig. 1f-g; 2e-g)..

Embriogénesis

Hasta el día 5 PP el cigoto permanece indiviso (Fig. 2b). La primera división del cigoto se observó a los 5 DPP. Esta primera división origina la célula basal y a la célula apical, precursoras del suspensor y del embrión propiamente dicho, respectivamente (Fig.1c; 2c). El embrión globular 8-celular fue observado el día 6 PP con un tamaño promedio de 1.75 μm de diámetro para ambas combinaciones (Fig.1e; 2d) (Tabla 1). El crecimiento del embrión continuó normal con una tamaño promedio de 3.1 μm y 2 μm a los 8 DPP para *Ns x Ne* y *Ne x Ns* respectivamente (Tabla 1). A los 10 DPP los tamaños de los embriones observados alcanzaron un tamaño de 3 a 9 μm para ambas combinaciones.

Tabla 1: Desarrollo embrionario en cruzamientos interespecíficos compatibles entre *N. scoparia* y *N. ericoides*. Diámetro en micrones del embrión a los 6, 8 y 10 DPP*.

	6 DPP (μm)	8 DPP (μm)	10 DPP (μm)
<i>N. scoparia x N. ericoides</i>	1.75	3.1	3-8.5
<i>N. ericoides x n. escoparia</i>	1.75	2	3-9.1

*DPP; Días Posteriores a la Polinización

Desarrollo del endotelio

Para ambas combinaciones el desarrollo del endotelio es normal, es decir 1-estratificado y acompaña el crecimiento del endosperma en forma armoniosa. El crecimiento del tejido se produce por divisiones de sus células en sentido anticlinal (Fig. 1f- h; 2a- g).

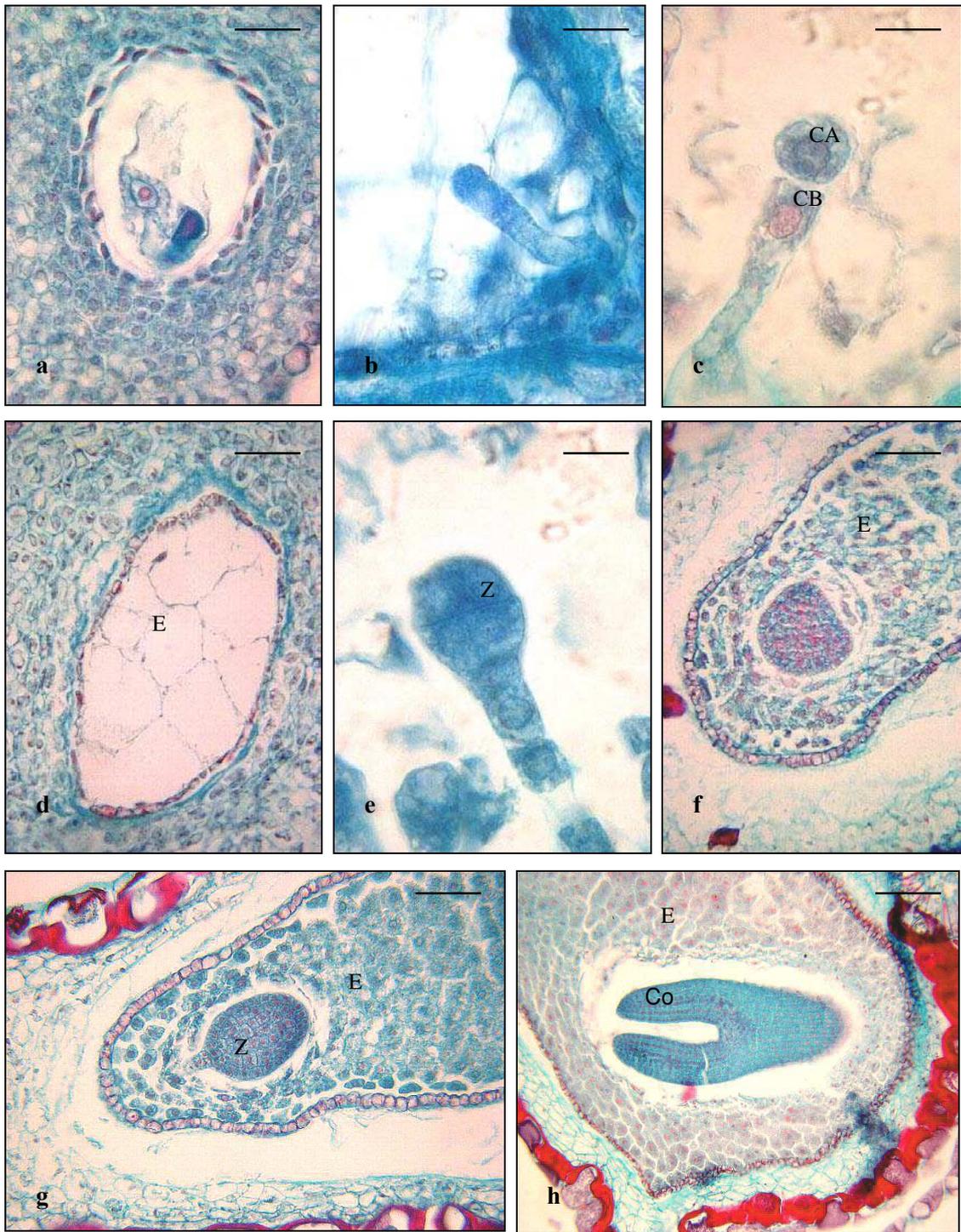


Figura 1: *N. ericoides* x *N. scoparia* (compatible) embriogénesis u endospermogénesis. **a-** 1 DPP **b-** 4 DPP. **c-** 5 DPP. **d-** 5 DPP, Endosperma celular. **E-** Embrión estado globular, 6 DPP. **f-** 9 DPP. **g-** 10 DPP. **h-** 23 DPP. **Abreviatura:** CA, célula apical; CB, célula basal; Z, cigoto; Co, cotiledón; E, endosperma. **Aumentos:** barras = 3 μ m (**a, d, f, g, h**), barras = 1 μ m (**b, c, e**)

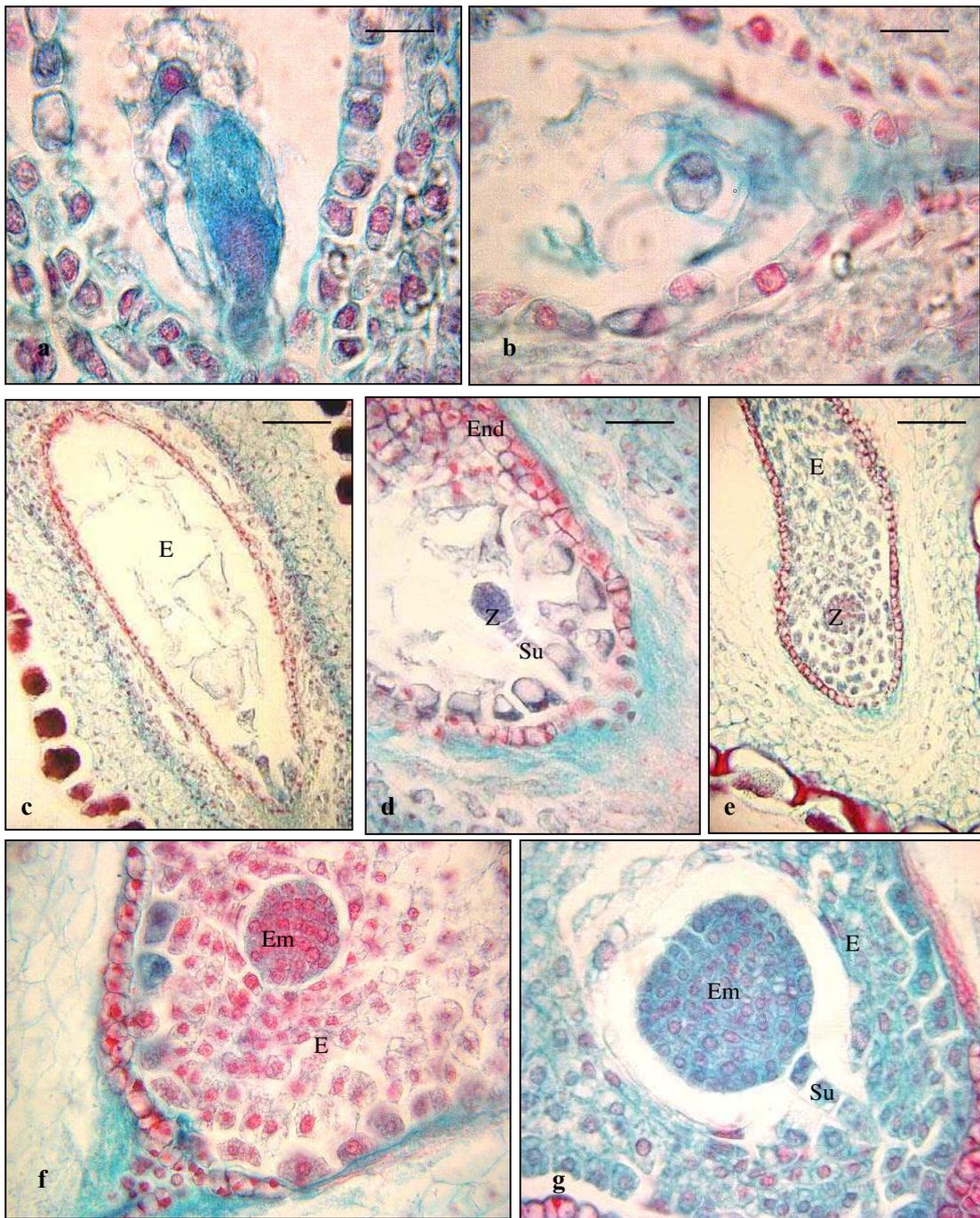


Figura 2: *N. scoparia* x *N. ericoides* (compatible), embriogénesis y endospermogénesis. **a-** 1 DPP. **b-** 3 DPP. **c-** 5 DPP. **d-** 6 DPP. **e-** 9 DPP. **f-** 9 DPP **g-** 10 DPP. **Abreviaturas:** E: Endosperma, End: endotelio, Su: suspensor, Z: cigoto, Em: embrión. **Aumentos:** barras = 1 μm (a, b) barras = 3 μm (d, e), barras = 5 μm (c, f, g)

DESARROLLO EMBRIONARIO EN CRUZAMIENTOS INTERESPECÍFICOS RECÍPROCOS INCOMPATIBLES.

A) *N. ericoides* x *N. linariaefolia* (*Ne* x *Nl*) y *N. scoparia* x *N. linariaefolia* (*Ns* x *Nl*).

Fecundación

En las combinaciones *Ne* x *Nl* (*N. ericoides* x *N. linariaefolia*) y *Ns* x *Nl* (*N. scoparia* x *N. linariaefolia*) se observó que el porcentaje de la fecundación fue 100 %..

Se observó que en el momento en el que el tubo polínico alcanza la micrópila el saco embrionario está maduro (Fig. 3a; 4a). En ambas combinaciones, la doble fecundación se produjo a los 2 DPP, es decir resultó similar a lo descrito en las combinaciones compatibles.

La doble fecundación fue normal al igual que lo observado en los cruzamientos compatibles: el tubo polínico descarga su contenido en una de las sinérgidas a través del aparato filar. La sinérgida receptora de la descarga del tubo polínico se diferencia de la otra a partir del momento de la descarga (Fig. 3a; 4a),. En ambas combinaciones la doble fecundación da origen al cigoto (Fig. 3b-h; 4b-g), producto de la fusión de la célula espermática con la ovocélula y a la célula endospermogénica, producto de la fusión de la otra célula espermática con la célula media.

Endospermogénesis

En ambas combinaciones, las primeras divisiones de la célula endospermogénica se inician a partir del día 3 PP (Fig. 4b). En la combinación *Ne* x *Nl* a los 5 DPP se interrumpe el desarrollo del endosperma. Contrariamente, el endotelio continúa su crecimiento, que se vuelve descontrolado proyectándose hacia el espacio ocupado por el endosperma y terminando por comprimirlo completamente, entre los días 10 (Fig. 3f), 11 y 12 PP (Fig. 3g-h). Entre los días 9 y 13 PP se observa que el endosperma está poco desarrollado, es

anormal y no acumula reservas (Fig. 4d-h). En la combinación *Ns* x *Ne* el endotelio tarda mas tiempo en ocupar el lugar del endosperma, alrededor del día 13 PP. Cabe destacar que en ambas combinaciones las células del endoperma en ningún momento cargan reservas, manteniéndose siempre la vacuola central (Fig. 4f-h).

Embriogénesis

En ambos cruzamientos, el cigoto permanece indiviso hasta el día 5 PP (Fig. 3b). La primera división origina la célula basal y la célula apical (Fig. 3c). La embriogénesis es normal hasta el día 6 PP, y los embriones alcanzan tamaños de 1 μ m de diámetro, lo cual significa embriones de menor desarrollo (57 %) comparados con las combinaciones compatibles (*Ne* x *Ns* y *Ns* x *Ne*) en este estado. A partir del día 7 PP se observó un mayor crecimiento en la combinación *Ne* x *Nl*, llegando a tamaños máximos de 2.5 μ m de diámetro el día 10 PP (Fig. 3e). En contrapartida en la combinación *Ns* x *Nl*, muy pocos embriones fueron detectados con tamaños superiores a los 2 μ m de diámetro. Los tamaños máximos se alcanzaron alrededor del día 13 PP (Fig. 4h).

Desarrollo de endotelio

Para ambas combinaciones, *Ne* x *Nl* y *Ns* x *Nl*, el desarrollo del endotelio es normal en los primeros días, sufriendo una hiperplasia semejante en los dos casos a partir del 7 y 9 DPP respectivamente: se comenzó a observar un crecimiento anormal del endotelio originado por divisiones anticlinales de las células del mismo (Fig. 3e-h; 4f-h) que no fueron acompañadas con un desarrollo del endosperma. Esto provocó un plegamiento del tejido, el cual invadió el espacio ocupado por el endosperma (Fig. 3h).

Si bien en una primera etapa este plegamiento podría deberse a la falta de desarrollo del endosperma que lo acompañó, en días posteriores se verificó que se producía un

crecimiento anormal (hiperplasia), cuando se lo compara con el desarrollo del endotelio en los cruzamientos compatibles (Fig. 3h; 4h).

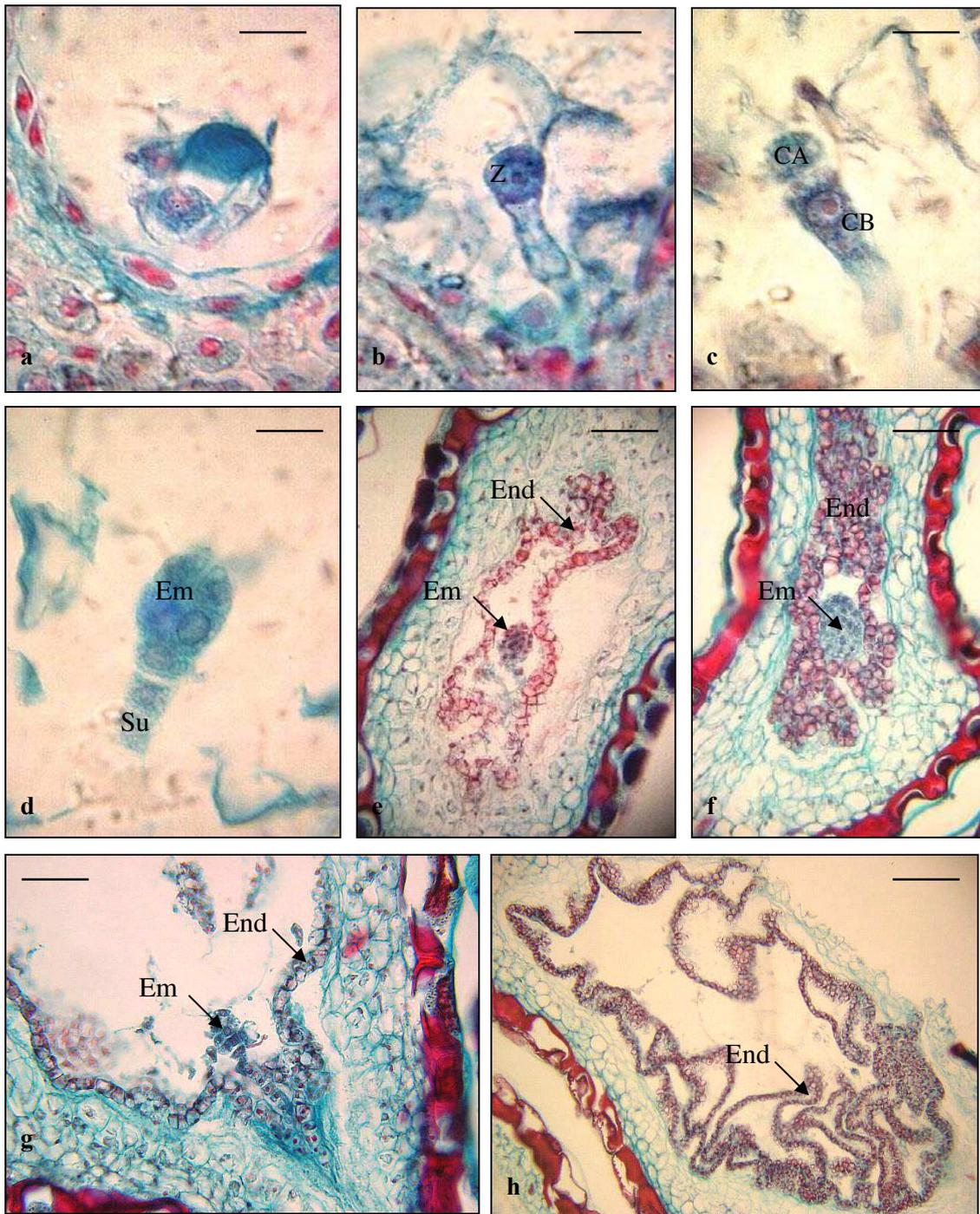


Figura 3: *N. ericoides* x *N. linariaefolia* (incompatible) embriogénesis y endospermogénesis. **a-** 2 DPP. **b-** 3 DPP. **c-** 5 DPP. **d-** 7 DPP. **e-** 10 DPP. **f-** 13 DPP. **g-** 10 DPP. **h-** 13 DPP. **Abreviatura:** CA, célula apical; CB, célula basal; End, endostelio; Em, embrión; Su: suspensor, Z: cigoto. **Aumentos:** barras = 1 μ m (**a, b, c, d**), 5 μ m (**e, f, g**), 10 μ m (**h**)

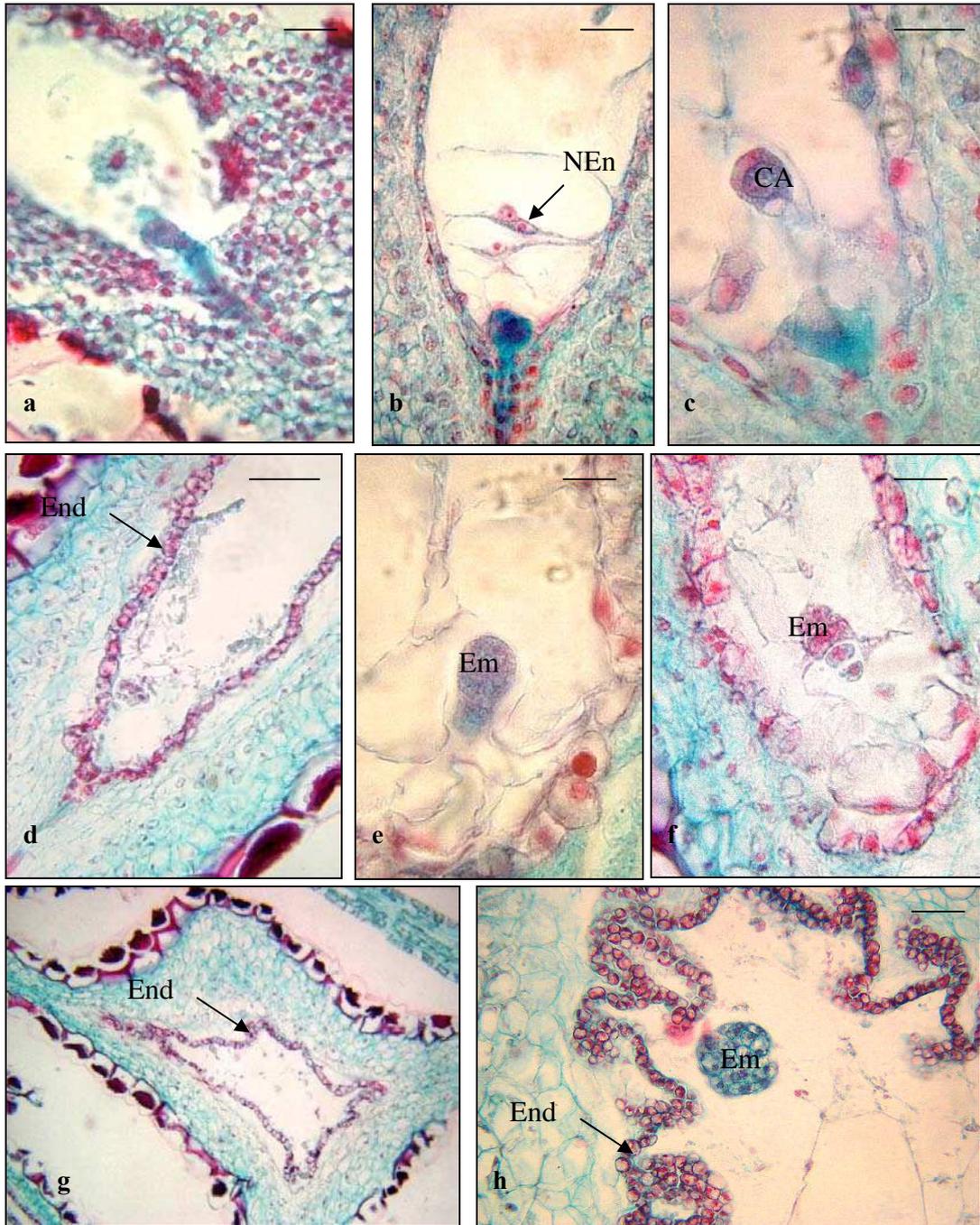


Figura 4: *N. scoparia* x *N. linariaefolia* (incompatible) embriogénesis y endospermogénesis **a-** 1 PP. **b-** Endospermogénesis, 3 DPP. **c-** 4 DPP. **d-** embrión a los 8 DPP. **e-** 8 DPP. **f-** 9 DPP. **g-** 9 DPP, endotelio anormal **h-** 13 DPP, endotelio anormal. **Abreviatura:** Em, embrión; End, endotelio; Nen, núcleos endospermogénicos. **Aumentos:** barras =1 μ m (**a**); 2.5 μ m (**b, e, f, h**); 5 μ m (**d**); 10 μ m (**g**)

B) *N. linariaefolia* x *N. ericoides* (Nl x Ne) y *N. linariaefolia* x *N. scoparia* (Nl x Ns)

Fecundación

En las combinaciones Nl x Ne (*N. linariaefolia* x *N. ericoides*) y Nl x Ns (*N. linariaefolia* x *N. scoparia*) el número de óvulos fecundados fue menor que en las combinaciones recíprocas. Los porcentajes de fecundación fueron del 25 % y 32 % para las combinaciones Nl x Ns y Nl x Ne respectivamente (Tabla 2).

Tabla 2.: Eficiencia de fecundación en cruzamientos interespecíficos incompatibles, utilizando *N. linariaefolia* como madre y *N. ericoides* y *N. scoparia* como padres. Número de óvulos fecundados 6 DPP^{*1} (tomando óvulos desarrollados) sobre el total de óvulos observados en cada campo ovárico. Entre paréntesis se indica el porcentaje.

<i>N. linariaefolia</i> x <i>N. ericoides</i> n° óvulos fecundados/n° óvulos totales (%) $\bar{x} = 32\%$	<i>N. linariaefolia</i> x <i>N. scoparia</i> n° óvulos fecundados/n° óvulos totales (%) $\bar{x} = 25\%$
7/16 (43)	2/15 (13)
5/22 (22)	1/10 (10)
5/20 (25)	2/14 (14)
5/13 (38)	6/14 (42)
5/14 (35)	2/18 (11)
2/14 (14)	8/17 (47)
2/18 (11)	6/15 (40)
1/11 (10)	6/11 (54)

*1 La cuantificación se realizó sobre 10 campos de observación.

Al igual que en los cruzamientos anteriores, en el momento en el que el tubo polínico alcanza la micrópila se observa que el saco embrionario está maduro (Fig. 5a; 6a). Se determinó que la doble fecundación se produce el día 3 PP en ambos cruzamientos, detectándose un retraso en la fecundación si comparamos los cruzamientos donde *N. ericoides* y *N. scoparia* son utilizadas como madres. En este proceso, el tubo polínico descarga su contenido en una de las sinérgidas a través del aparato filar. La sinérgida receptora de la descarga del tubo polínico se diferencia de la otra en forma similar a la encontrada en las combinaciones estudiadas anteriormente (Fig. 5a; 6a). En ambas

combinaciones, la doble fecundación da origen al cigoto (Fig. 5b-h; 6c-g) y a la célula endospermogénica.

Endospermogénesis

En ambas combinaciones, a partir del día 4 PP se observan las primeras divisiones de la célula endospermogénica.

En la combinación $Nl \times Ns$, el día 6 PP, se observa en la mayoría de los óvulos fecundados una interrupción en el desarrollo del endosperma (Fig. 5b). Sólo un número muy pequeño (2 de 132 óvulos observados) presenta endospermogénesis normal con acumulación de reservas a partir del 9 DPP (Fig. 5e- h). Sin embargo, este endosperma que desarrolla, al final aborta por la hiperplasia del endotelio. En esta combinación ($Nl \times Ns$) muchos embriones comienzan su desarrollo sin endosperma (Fig. 5c).

En la combinación $Nl \times Ne$ la endospermogénesis se presenta semejante a la combinación anterior (Fig. 6c- e). Sin embargo, el número de óvulos con endospermogénesis avanzada, es decir con acumulación de reservas, es mayor. Al igual que en la combinación anterior, el endosperma con reservas termina abortando por la hiperplasia del endotelio (Fig. 6e- g).

Embriogénesis

En ambos casos alrededor del día 6 PP se observa la presencia de embriones (Fig. 5b; 6c), pero estos presentan malformaciones. La embriogénesis no sigue el programa de desarrollo normal (Fig. 5b-f), y los embriones malformados alcanzan un tamaño máximo de 2 μm y 1.5 μm (Fig. 6c), para las combinaciones $Nl \times Ns$ y $Nl \times Ne$ respectivamente.

Desarrollo de endotelio

Para ambas combinaciones el endotelio comienza su desarrollo de manera normal en los primeros días, pero a partir del día 6 PP, se inicia una hiperplasia del mismo, semejante a la que se produce en los dos casos arriba-mencionados. El crecimiento anormal de las células del endotelio se produce por divisiones periclinales (es decir, paralelas al plano longitudinal medio del óvulo) (Fig. 5b- h; 6d- g). El endotelio comprime ambos, endosperma y embrión ocupando finalmente el espacio de los mismos (Fig. 5f- h; 6f- g).

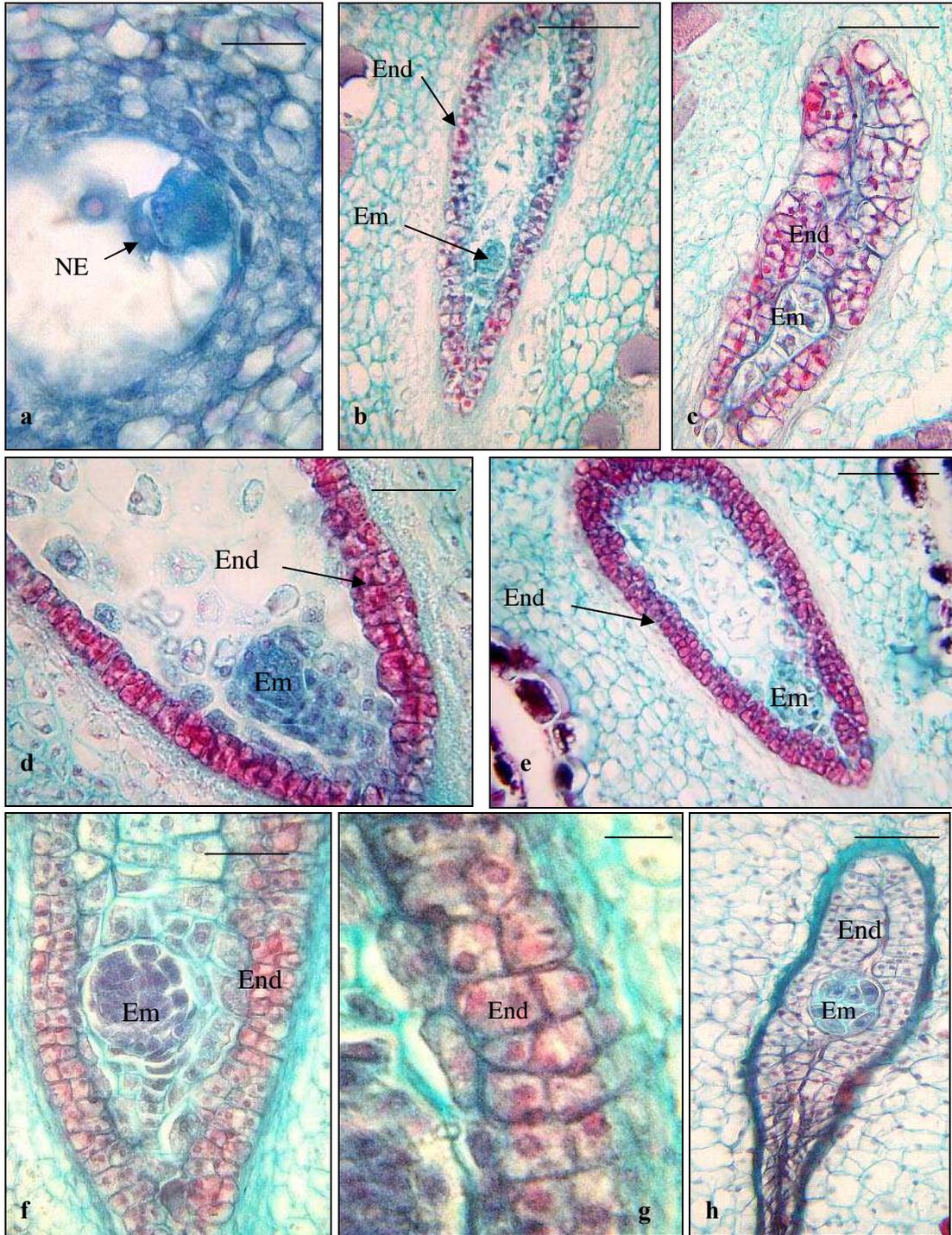


Figura 5: *N. linariaefolia* x *N. scoparia* (incompatible), embriogénesis y endospermogénesis. **a-** 1 DPP. **b-** 6 DPP. **c-** 7 DPP. **d-** 8 DPP. **e-** 9 DPP. **f-** 10 DPP. **g-** 10 DPP. **h-** 13 DPP. **Abreviatura:** Em, embrión; End, endotelio; NE, núcleos endospermáticos. **Aumentos:** barras = 1 μ m (**g**); 2.5 μ m (**d, f, h**); 5 μ m (**a**); 10 μ m (**b, c, e**)

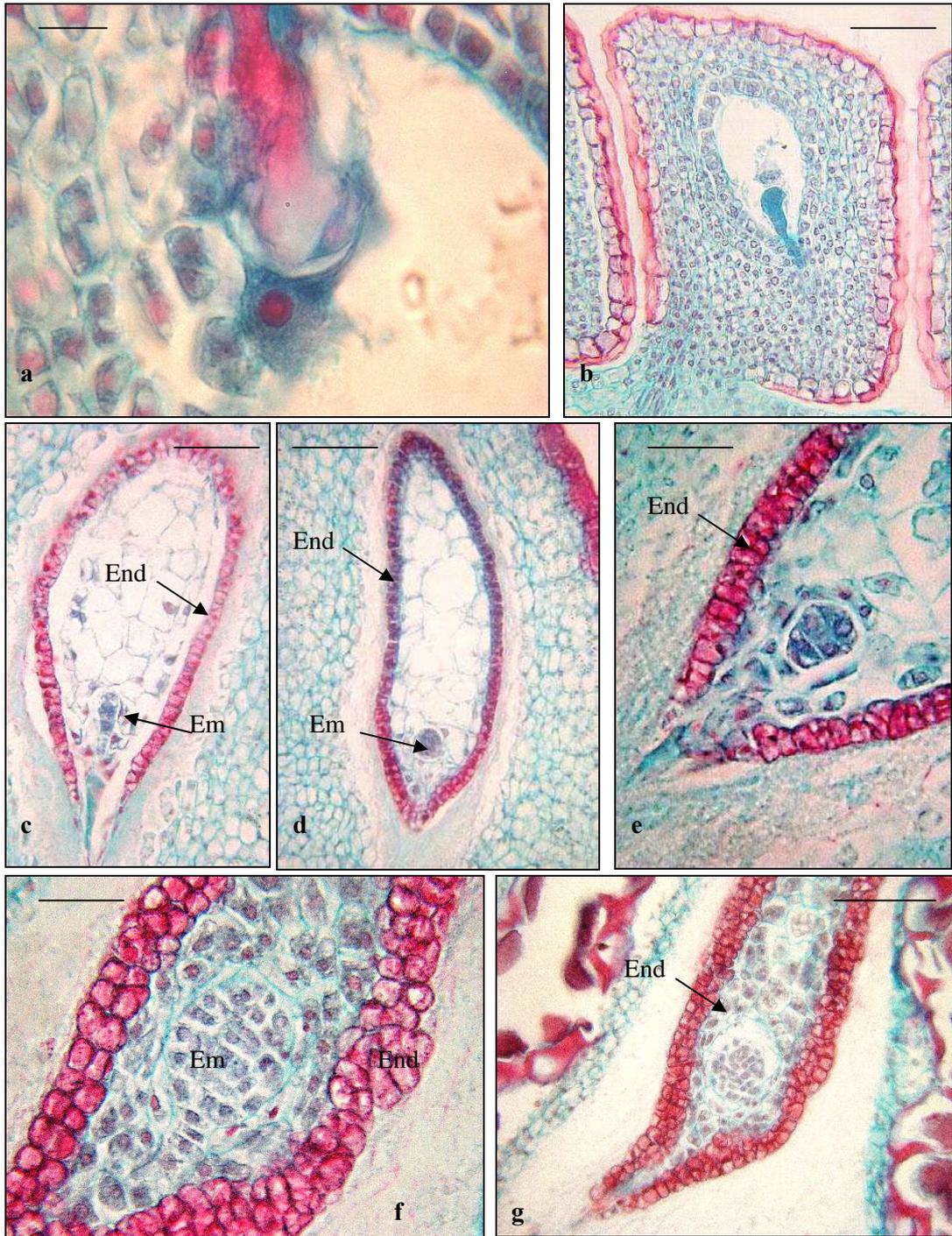


Figura 6: *N. linariaefolia* x *N. ericoides* (incompatible), embriogénesis y endospermogénesis. **a-** 1 DPP. **b-** DPP. **c-** 6 DPP. **d-** 8 DPP. **e-** estado de 8 DPP **f-** 9 DPP **g-** 10 DPP. **Abreviatura:** Em, embrión; End, endotelio **Aumentos:** barras = 1 μm (**a**); 2.5 μm (**e, f**); 10 μm (**c, d, b**).

DISCUSIÓN

Los cruzamientos interespecíficos entre *N. ericoides* y *N. scoparia* resultaron compatibles, como era de esperar considerando no sólo la alta eficiencia de óvulos fecundados y el normal desarrollo del embrión y del endosperma, sino además los resultados filogenéticos obtenidos en esta tesis (Ver capítulo I). Más aún, el análisis cariotípico reportado por Acosta *et al.* (2006), muestra que ambas especies están agrupadas por el número cromosómico $2n=18$, y separadas de las restantes especies, estas últimas con número cromosómico $2n=16$. En síntesis, los estudios embriológicos, filogenéticos y cariológicos se apoyan unos a otros y permiten prever el éxito en la hibridación. Más aún estos resultados confirman la validez en *Nierembergia* del marcador molecular seleccionado en los estudios filogenéticos.

En las combinaciones incompatibles ($Nl \times Ne$; $Nl \times Ns$; $Ne \times Nl$ y $Ns \times Nl$), se observaron anomalías en el desarrollo tanto del endosperma como del embrión, las que fueron acompañadas de una hiperplasia del endotelio. Las anomalías mostraron características diferentes de acuerdo al genotipo materno utilizado.

En efecto, en las combinaciones donde *N. linariaefolia* era utilizada como madre ($Nl \times Ns$ y $Nl \times Ne$), se demostró que el desarrollo del endosperma primero y del embrión después, son interrumpidos por la hiperplasia del endotelio. En estos cruzamientos, la hiperplasia se genera por divisiones periclinales de las células del endotelio (esto es, divisiones paralelas al plano longitudinal medio del óvulo), que conducen a que el endotelio que normalmente es 1-estratificado, se convierta en un tejido pluri-estratificado. Este endotelio engrosado invade el espacio ocupado por el endosperma en desarrollo. El endosperma cuyo desarrollo hasta este estado es normal, (incluso entra en la fase de acumulación de reservas), interrumpe el desarrollo y a esta interrupción le sucede el aborto del embrión. Un proceso similar es detectado en

cruzamientos interespecíficos entre *Nicotiana rustica* L. x *N. glutinosa* L. por Cooper y Brink (1940), quienes proponen como hipótesis que la hiperplasia del endotelio se convierte en una barrera que impide el paso de nutrientes, con la consecuente interrupción del crecimiento del endosperma primero y del embrión después. Brink y Cooper (1939) utilizan el término “esterilidad somatoplástica”, por primera vez para referirse a los óvulos fecundados colapsados en *Medicago sativa* L, y así describir la formación de semillas inviables, observando un crecimiento anormal del nucelo, o del endotelio (hiperplasia) conjuntamente con la falta de nutrición del endosperma y el aborto del mismo. Una situación semejante se presenta en cruzamientos interespecíficos en el género *Datura*, donde se encontró una proliferación del endotelio originada por la intensa y rápida división celular en todos los planos produciendo una masa de tejido de origen tumoral (Lee y Cooper, 1958).

En estas combinaciones (*N. linariaefolia*, E) también se observaron malformaciones embrionarias, que podrían sugerir ausencia de regulación del ciclo de divisiones celulares. Al respecto, Grossniklaus *et al.* (1985), en *Arabidopsis* Schur muestran el control que ejercen un grupo de genes “*polycomb*” maternos sobre el desarrollo del embrión. Estos mismos autores sugieren como hipótesis que, en estos cruzamientos, la falta de señales desde el tejido materno, causada por la barrera que genera el endotelio no funcional, impide el ciclo de divisiones normales en la embriogénesis. Esta teoría se fortalece con estudios realizados en mutantes de *Arabidopsis* por Rahagavan (1997) y Mayer *et al.* (1993) que muestran el efecto de genes extra-cigóticos en el proceso de embriogénesis. En estas mutantes el tejido esporofítico y el gametofítico materno juegan un rol primordial en la regulación del ciclo de divisiones celulares del embrión.

En los cruzamientos recíprocos, en los que *N. linariaefolia* es utilizada como padre ($N_s \times N_l$ y $N_e \times N_l$), se observó una hiperplasia del endotelio, provocada por divisiones anticlinales que generaron un endotelio 1-estratificado pero plegado ocupando el lugar del endosperma. Esta malformación originó un endotelio semejante al encontrado en algunas especies que tienen un endosperma ruminado como carácter propio, tal es el caso de *Artabotrys odoratissimus* Blume (Johri *et al.* 1992), entre otros. En los cruzamientos $N_s \times N_l$ y $N_e \times N_l$ la degeneración del endosperma fue previa a la del endotelio ya que se iniciaba con la interrupción del desarrollo del endosperma, aunque posteriormente continuaba por divisiones anticlinales de las células endoteliales, de una manera no controlada. Esto parece sugerir que en este proceso hay una ausencia de señales responsables del control en el desarrollo del endotelio asociada a la interrupción temprana en el desarrollo del endosperma. Al respecto cabe señalar que estudios realizados en *Solanum americanum* Mill, sobre los genes, SaPIN2a y SaPIN2b, evidencian que el funcionamiento normal del endotelio y el correcto desarrollo del endosperma y el embrión son procesos interdependientes, regulados por vías comunes (Sin *et al.* 2006).

La interrupción del desarrollo del endosperma podría ser ocasionada por un desbalance en la relación genómica del mismo (Dinu *et al.* 2005). Desbalances de este tipo son descritos por Masuelli y Camadro (1997) en cruzamientos interespecíficos inter-NBE de especies salvajes del género *Solanum*, donde el NBE juega un rol principal en la interrupción del desarrollo del endosperma seguido por una hiperplasia en el endotelio. Al respecto, la relación genómica materna:paterna 2:1 en el endosperma ha sido considerada una condición necesaria para el éxito del desarrollo del endosperma tanto en cruzamientos intraespecíficos como interespecíficos (Quarin, 1999). La viabilidad de las semillas no siempre depende directamente del nivel de ploidía; de hecho, en *Solanum tuberosum* L., se

postula que son dos o tres genes los responsables del sistema NBE (Dinu *et al.* 2005). Aún más, Masuelli y Camadro (2005) reportan que el desbalance endospermico está dado por “fuerzas” (o valores) características de cada especie, pudiendo estar relacionado con la carga alélica o el número de genes involucrados.

Teniendo en cuenta estudios cromosómicos en el género *Nierembergia*, donde se reporta que *N. ericoides* y *N. scoparia* tienen $2n=2x=18$ y *N. linariaefolia* con $2n=2x=16$ (Acosta *et al.* 2006), el presente estudio demostró que el inicio normal de la endospermogénesis se da cuando la especie con menor número cromosómico se utiliza como madre ($2n=16 \times 2n=18$), y que, contrariamente, en el cruzamiento recíproco ($2n=18 \times 2n=16$) el desarrollo del endosperma se interrumpe. En este caso la hipótesis de la incompatibilidad dada por un desbalance del número endospermico estaría vinculada a mayor fuerza génica en aquellas especies con mayor número cromosómico gamético.

En las combinaciones incompatibles mostradas en este estudio se encontraron dos situaciones que corresponden a diferentes mecanismos de incompatibilidad y que sugieren combinaciones potencialmente más convenientes para realizar la hibridación y luego aplicar técnicas de rescate embrionario. Se trata de los casos en que *N. linariaefolia* actúa como padre. Los cruzamientos recíprocos (*N. linariaefolia* E) son descartados principalmente porque el desarrollo embrionario se vuelve anormal en estados demasiado tempranos como para asegurar el éxito de la aplicación de la técnica de rescate embrionario. Por el contrario, las combinaciones *Ne* x *Nl* y *Ns* x *Nl*, en las que la incompatibilidad está dada por un desbalance endospermico, parecieran ser las putativas para la obtención de híbridos.

Finalmente, cabe acotar que Dinu *et al.* (2005) aplican en el género *Solanum*, técnicas de rescate embrionario asociadas a hormonas 2,4-D, para obtener exitosamente

híbridos inter-NBE e intra-NBE. El rol de las hormonas en estos procesos amerita futuros estudios.

Capítulo IV

Hibridación interespecífica entre *N. scoparia* y *N. ericoides*

INTRODUCCIÓN

Para realizar una buena selección de individuos, en el mejoramiento de plantas, se debe tener suficiente variabilidad genética en las poblaciones originales. Si la variabilidad es escasa, es necesario desarrollar nuevos tipos por hibridación entre especies, tratamientos mutagénicos y/o cambios en los niveles de ploidía (Horn, 2002). En los cultivos ornamentales la hibridación interespecífica es considerada uno de los recursos más importante para la obtención de variación genética (Van Tuyl y De Jeu, 2005). En efecto, los cruzamientos interespecíficos fueron herramientas básicas en programas de mejoramiento de cultivos ornamentales tales como *Rosa* L., *Chrysanthemum* L., *Lilium* L., *Gladiolus* L., *Tagetes* L., *Delphinium* L., *Freesia* klatt, *Hippeastrum* Herb. y *Alstroemeria* L. (Van Tuyl *et al.*, 2002) entre otros.

El programa de mejoramiento en el género *Nierembergia* Ruiz & Pav, en el marco del cual se llevó a cabo esta tesis, se seleccionaron individuos provenientes de poblaciones segregantes, para la obtención de variedades ornamentales de propagación agámica.

Para la obtención de estos materiales fue utilizada la hibridación interespecífica entre *N. scoparia* Sendtn y *N. ericoides* Miers La elección de estas especies se logró, por una parte, teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el análisis filogenético, la relación Estigma-Polen/Estilo-Tubo polínico y los resultados provenientes de los estudios de la embriogénesis y endospermogénesis, todos aspectos que emergieron de esta tesis. Otro aspecto que se tuvo en cuenta para la elección de estas dos especies, fue el componente ornamental que se expresaba en condiciones de cultivo bajo invernáculo como: abundante floración, largo período de floración, baja susceptibilidad a plagas y enfermedades, bajo requerimiento de podas y fácil manejo para el formado de la planta en maceta. También se tuvo en cuenta la facilidad de propagación agámica (enraizamiento por estacas) de las especies involucradas. El comportamiento y la expresión de estos caracteres fue diferente

entre ambas especies: *N. scoparia*, tiene flores blancas con centro lila y amarillo, mostró una gran adaptabilidad a condiciones de cultivo con buena capacidad para su propagación vegetativa, aunque tiene aspectos negativo como la gran altura alcanzada en maceta (de 0.5 hasta 1 m), y su arquitectura laxa que la hace menos vistosa desde el punto de vista ornamental (Soto *et al.* 2007). Por otra parte *N. ericoides*, no tiene variabilidad en el color de la flor siendo totalmente blancas con centro amarillo, su período de floración es mayor que *N. scoparia* y produce mas cantidad de flores (Soto *et al.* 2007). Dos aspectos negativos fueron encontrados en esta última especie, uno es la dificultad para ser propagada agámicamente y la segunda la susceptibilidad a plagas (trips) observada en condiciones de cultivo bajo cubierta (Soto *et al.* 2007).

Los cruzamientos interespecíficos dirigidos fueron realizados con el objetivo de seleccionar individuos que reunieran características favorables de las dos especies progenitoras.

La corroboración de los híbridos se realizó a través de la cuantificación de ADN por citometría de flujo. El análisis se realizó utilizando DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) como fluorocromo y luz ultravioleta, con una absorbancia de 350 nm (Johnston *et al.* 1999) y una emisión de 450 nm (Dolezel, 1995).

Si bien este fluorocromo no puede ser usado para estimar el contenido de ADN, ya que se pega preferentemente a las bases adenina-timina (AT) (Kapusciniski, 1995), en estudios específicos puede ser usado para la identificación de niveles de ploidía, arreglos en las pares de bases y estructura de la cromatina en estudios específicos (Manzini *et al.* 1983).

La selección de esta técnica se basó en lo reportado por Buitendijk *et al.* (1997) quienes identificaron con éxito híbridos interespecíficos en el género *Alstroemeria* usando citometría de flujo y DAPI como fluorocromo, mediante la obtención de valores intermedios en los promedios de fluorescencia.

Este análisis permitió también evaluar la cercanía de las especies progenitoras a través de la estabilidad en el contenido de ADN conjuntamente con la evaluación de la fertilidad en los híbridos que fue obtenida mediante el recuento de granos de polen no abortados con la metodología citada por Alexander (1969). Esta técnica si bien presenta desventajas ya que en algunos casos sobrestima la viabilidad (Greissl, 1989), presenta como ventaja un recuento fácil por el contraste que provoca la tinción.

La evaluación agronómica de las características ornamentales fue realizada en condiciones de cultivo bajo invernáculo sobre la población segregante.

Como etapa final fueron seleccionados individuos superiores, en cuanto a características ornamentales, para ser evaluados en producción siguiendo los pasos requeridos para el registro de variedades de propagación agámica.

OBJETIVOS

- Obtener híbridos interespecíficos a partir de la información reportada en los estudios embriológicos (Capítulo III).

- Evaluar la estabilidad genómica y la fertilidad de los híbridos, que permite corroborar la cercanía genética entre las especies progenitoras reportada en el análisis filogenético (Capítulo I).

- Seleccionar individuos agronómicamente superiores para la obtención de variedades ornamentales de propagación agámica.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIAL VEGETAL

Para los cruzamientos interespecíficos se utilizaron plantas adultas correspondientes a *N. ericoides* (Cod. IF: **20020320b2**), y *N. scoparia* (Cod. IF: **20051213a1**) (Anexo I- B)

METODOLOGÍA

Cruzamientos dirigidos

Los cruzamientos dirigidos fueron efectuados en estado de pimpollo. La emasculación fue realizada previa polinización. Los pimpollos fueron abiertos con una pinza, extrayendo las anteras conjuntamente con la corola. El polen, extraído de flores en anthesis del progenitor masculino, fue inmediatamente depositado sobre el estigma de los pimpollos. La polinización fue realizada durante el mediodía.

Siembra y cultivo de híbridos

Las semillas fueron sumergidas en ácido giberélico (100 ppm) durante 8 horas, seguidamente fueron enjuagadas tres veces con agua destilada y puestas a germinar en cajas de Petri de vidrio con papel absorbente a temperaturas de 20-35 °C. Las plántulas fueron trasplantadas a plug (90 alvéolos) con un sustrato de turba:perlita:vermiculita (2:1:1) y cultivadas a temperaturas de 20-35 ° C. Una vez formada la base radicular las mismas fueron trasplantadas a maceta de 10 cm de diámetro y cultivados en los invernáculos del Instituto de Floricultura, INTA - Castelar, (34° 36´ latitud, 58° 40´ longitud).

Para obtener el promedio del porcentaje de germinación de los híbridos (F1) se realizaron 3 repeticiones con 50 semillas por repetición.

Manejo sanitario de las condiciones de invernáculo

Dentro del manejo de invernáculo se realizó un control sanitario preventivo de la siguiente manera: una pulverización sanitaria cada 15 días utilizando según las necesidades, fungicidas (Carbendazim Brometan, Captan, Sumilex 50 , Amistar y Systhane E), acaricidas (Acaristop 50 SC) e insecticidas (Applaud, Sumithion, Lupara, Clorpirisem, Padan 95 SP, Lannate 90 WP, Rubigam, Confidor 35 SC y Vertimec). La utilización de cada producto fue alternada.

También se efectuó fertilización sistemática del suelo con NPK 43:26:45 ppm una vez por semana. La forma de aplicación es fertirriego utilizando dosificadores hidráulicos (Dosatron).

Obtención de híbridos y de la población segregante

Para la obtención de híbridos fueron realizados cruzamientos interespecíficos dirigidos entre *N. scoparia* y *N. ericoides* y su recíproco. La compatibilidad entre ambas especies fue evaluada a través de la eficiencia reproductiva (frutos obtenidos/flores polinizadas y de la producción de semillas por fruto (n° semillas/fruto), tomando como testigo los cruzamientos intraespecíficos de *N. scoparia*.

Para la obtención de las poblaciones segregantes fueron tomados los híbridos (F1) con un porcentaje de fertilidad mayor al 90 % (Anexo IV– Tabla 3). Se realizaron dos tipos de cruzamientos dirigidos: endocruzas y retrocruzas.

Propagación agámica de individuos selectos

Para la propagación se tomaron estacas de 4-5 cm de longitud proveniente de ramas laterales de la planta madre. El material fue puesto a enraizar en plug de 92 alvéolos (una por cada alvéolo) con sustrato de turba:perlita:vermiculita 1:1:1 (v/v). El enraizamiento se

realizó sin la utilización de hormonas y bajo condición de microaspersión con una frecuencia de 10 segundos cada 5 minutos y temperaturas de 30-40 °C. Una vez enraizadas fueron pasadas a maceta de plástico y cultivadas de la misma manera que las plantas provenientes de la propagación por semillas.

Evaluación del contenido de ADN por citometría de flujo

Se analizó el contenido de ADN de las especies progenitoras, de la progenie híbrida y de las poblaciones segregantes provenientes de endocría y retrocruzadas.

Como planta patrón se utilizó *N. linariaefolia* Graham var *linariaefolia* poliploides (4n) (Johnston *et al.* 1999).

Para la extracción de núcleos fueron picados 20 mg de hoja fresca de la muestra y la misma cantidad del estándar, en forma conjunta con 0.5 ml del buffer de Otto I (Tabla 1) dentro de una caja de Petri de vidrio. Posteriormente la suspensión de núcleos fue pasada por un filtro de nylon 30µm.y vertida sobre el tubo receptor plástico, al cual se le adicionó 2 ml de buffer de tinción Otto II (Tabla 1) con DAPI [4mg/ml] (Otto, 1990).

Todas las muestras fueron analizadas con un equipo de citometría de flujo Modelo Partec PA (software Partec GmbH Alemania) con una lámpara HBO 100 W/2. Los parámetros del equipo fueron fijados en: una ganancia de 310, una lectura de 0 hasta 999 y una velocidad de flujo de 2 µl/s.

El análisis se realizó mediante tres repeticiones separadas en el tiempo de cada planta evaluada con tres lecturas para cada repetición (n°) (Dolezel y Bartos, 2005).

Para la cuantificación de ADN fue calculada la intensidad relativa de fluorescencia (IRF) (Mishiba *et al.* 2000), la cual reflejó el contenido relativo de ADN nuclear de las muestras respecto del patrón y correspondió al cociente entre las medias de intensidad de fluorescencia de la muestra (divisor) y la del estándar interno o patrón (dividendo).

Tabla 1: Preparación de los buffer utilizados para el análisis de ADN por citometría de flujo.

Buffer Otto I		Buffer Otto II	
Acido cítrico monohidratado 0.1M	4.2 g	Na ₂ HPO ₄ . 12H ₂ O	28.65g
Tween 20 0.5% v/v	1 ml		
Llevar a 200 ml de volumen final, filtrar el buffer con un filtro 0.22 µm y conservar a 4°C.		Llevar a 200 ml de volumen final, filtrar el buffer con un filtro 0.22 µm y conservar a temperatura ambiente.	

Fuente Otto, 1990

Fertilidad de híbridos

La fertilidad de las plantas de las poblaciones híbridas y segregantes fue evaluada mediante la observación de granos de polen abortados. Para el recuento de la cantidad de polen abortado y no abortado fue realizada una tinción diferencial (Alexander, 1969). Para el análisis se colectaron granos de polen provenientes de flores en estado de anthesis. Los mismos fueron colocados sobre un porta-objeto con una gota de la solución de tinción durante 15'. La esterilidad del polen esta asociada a granos de polen teñidos de color verde claro y la viabilidad a granos de polen teñidos de color rojo. El porcentaje de polen fértil se determinó sobre un total de 400 granos.

Caracterización agronómica de la progenie segregante obtenida de los cruzamientos interespecíficos (*N. scoparia* y *N. ericoides*)

A partir de una población de 335 plantas correspondientes a las poblaciones segregantes, fueron seleccionadas 57 plantas. Dicha selección se realizó basándose en la arquitectura de la planta, la cual esta dada por el ángulo de inserción y cantidad de ramas laterales. Fueron identificadas arquitecturas diferentes: Individuos rastreros (ramificaciones con un ángulo cercano a 45°, tendiendo a ser paralelas a la tierra), individuos erectos (ramificaciones con un ángulo menos a 10°, tendiendo a ser perpendicular a la tierra),

individuos compactos (con muchas ramificaciones y ángulos de inserción cercano a 10°). Esta selección fue realizada en plantas adultas. Todos los individuos selectos fueron propagados agámicamente. Al mes fue evaluado el número de ramificaciones por estaca enraizada y seguidamente fueron trasplantadas a macetas plásticas (10 cm. de diámetro) y cultivadas en condiciones de invernáculo.

Al inicio de floración se evaluó altura y diámetro de planta, número de flores y diámetro máximo de flor. En esta etapa fue observada la formación de la planta como producto final para su comercialización.

RESULTADOS

Obtención de híbridos (F1)

La eficiencia reproductiva (ER) fue mayor al 90 %, en todas las combinaciones de cruzamientos (Tabla 2).

Tabla 2: Eficiencia reproductiva ER (frutos obtenidos / n° de flores polinizadas (%))

<i>N. ericoides</i> x <i>N. scoparia</i>	93 (56/60)
<i>N. scoparia</i> x <i>N. ericoides</i>	91 (55/60)
<i>N. scoparia</i> x <i>N. scoparia</i>	95 (57/60)

La producción de semillas por fruto en la combinación *N. scoparia* x *N. ericoides* (47.16 semillas/fruto) fue 57 y 53.79 %, menor a la obtenida en las combinaciones *N. scoparia* x *N. scoparia* (110 semilla/fruto) y *N. ericoides* x *N. scoparia* (87.66 semillas/fruto) respectivamente (Tabla 3).

Tabla 3: Producción promedio de semillas/fruto en cruzamientos interespecíficos (50 frutos)

<i>N. ericoides</i> x <i>N. scoparia</i>	87.66 a
<i>N. scoparia</i> x <i>N. ericoides</i>	47.16 b
<i>N. scoparia</i> x <i>N. scoparia</i>	110 a

Letras diferentes indican diferencias significativas utilizando el test de Tukey ($p < 0.05$)

En la tabla 4 se observa que no hay diferencias significativas, en el porcentaje de germinación, entre las combinaciones híbridas (85 y 90 % para *N. ericoides* x *N. scoparia*, *N. scoparia* x *N. ericoides* respectivamente) y el testigo (75 % para *N. scoparia* x *N. scoparia*) (Fig.1).

Tabla 4: Promedio de germinación de semillas híbridas (F1) y el testigo (%)

<i>N. ericoides</i> x <i>N. scoparia</i>	85 a
<i>N. scoparia</i> x <i>N. ericoides</i>	90 a
<i>N. scoparia</i> x <i>N. scoparia</i>	75 a

Letras iguales indican que no hay diferencias significativas utilizando el test de Tukey (p< 0.05)

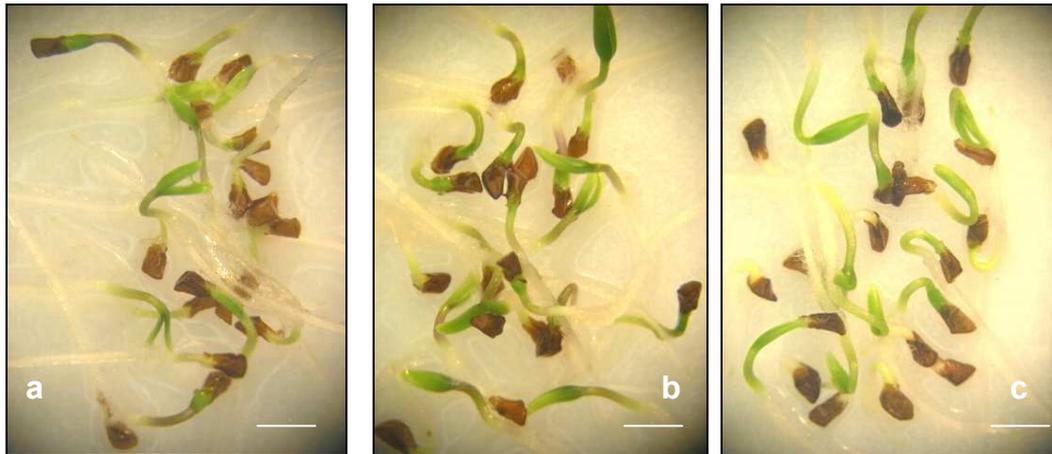


Figura 1: Semillas híbridas puestas a germinar, 72 hs posterior al tratamiento con Acido Giberélico. **a** - *N. ericoides* x *N. scoparia*. **b** - *N. scoparia* x *N. ericoides*. **c** - *N. scoparia* x *N. scoparia*. **Aumentos:** Barra = 5 mm (a; b; c)

Estabilidad de la progenie segregante

El análisis del contenido de ADN obtenido a través del Índice de Intensidad de Fluorescencia Relativo (IFR) (Mishiba *et al.* 2000) de las especies progenitoras, mostró una diferencia significativa entre ambas, con un valor del IFR promedio de 0.59078998 y 0.52929102 para *N. ericoides* y *N. scoparia* respectivamente (Tabla 5).

Tabla 5: Índice de Intensidad de Fluorescencia Relativo (IFR) (promedio)

Origen de plantas analizadas	IFR (8) ± SD
<i>N. ericoides</i>	0.59078998 a ± 0.0032
<i>N. scoparia</i>	0.52929102 b ± 0.013
híbrido F1	0.55341944 ab ± 0.014
híbrido x híbrido (F2)	0.58832876 b ± 0.0073
híbrido x <i>N. scoparia</i> (retrocruza)	0.59337811 a ± 0.012
híbrido x <i>N. ericoides</i> (retrocruza)	0.56711235 a ± 0.019

Letras diferentes indican diferencias significativas utilizando el test de Tuckey (p< 0.05) fuente de datos Anexo IV– Tabla 1

Si bien los valores promedios de IFR de los híbridos son intermedios no mostrando diferencia significativa con las especies progenitoras (Tabla 5), la figura 2 muestra una tendencia diferencial en la dispersión de estos valores.

Los valores de IFR de los híbridos (F1) tienen una dispersión semejante a los valores de *N. scoparia*, mientras que los valores de los híbridos F2 mostraron un aumento en la dispersión que sobrepasa los valores de los progenitores (Fig.2). La dispersión de los valores IRF en las progenies de las retrocruzas mostraron que hay una correlación positiva con la dispersión de los progenitores.

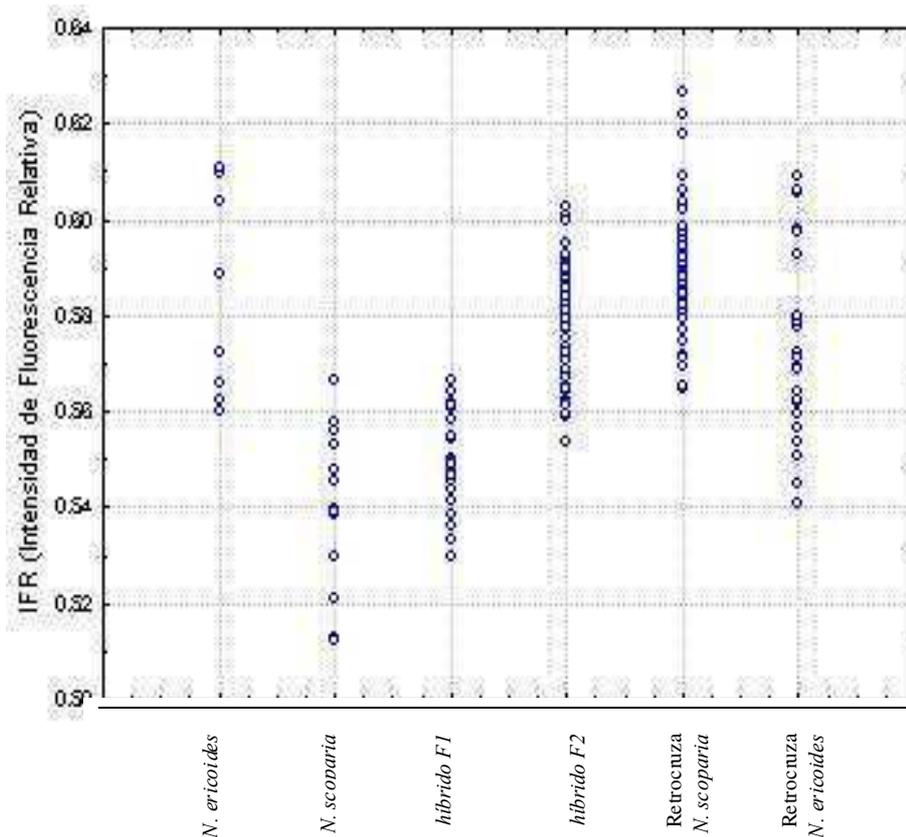


Figura 4: Dispersión del valor de Intensidad de Fluorescencia Relativo teñidos con DAPI en *N. ericoides*; *N. scoparia*; híbrido F1 (*N. scoparia* x *N. ericoides*); N. híbrido F2; híbrido x *N. ericoides* y híbrido x *N. scoparia*. Como patrón fue utilizado *N. linariaefolia* 4n (Fuente de los datos; Anexo IV – Tabla 1)

Con respecto a los desvíos estándar de los promedios del IFR se observa que en todos los casos van desde 0.020 a 0.045, con lo cual muestran una dispersión de los valores IFR semejantes en todos los casos.

Fertilidad de los híbridos (F1 y progenie segregante)

Del recuento de granos de polen no abortados en las plantas híbridas (F1), se observó que 78 % de las plantas evaluadas, presenta un porcentaje mayor al 60 % de polen no abortado, encontrando solamente tres plantas con valores menores al 50 % (Anexo IV-Tabla 3) (Fig. 5a). Resultados semejantes fueron obtenidos en el recuento sobre la población segregante: 82 % de plantas presentaron un porcentajes de granos de polen no abortados mayores al 60% (Fig. 5b).

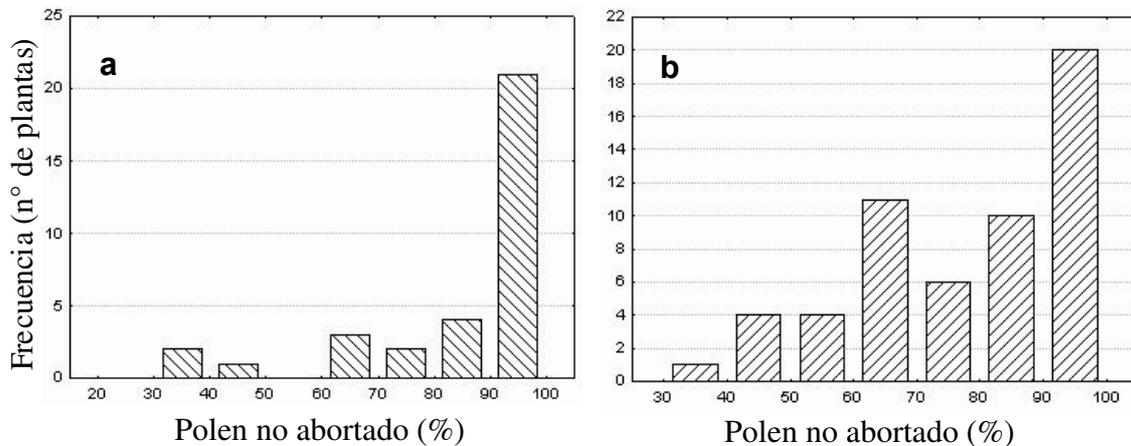


Figura 5: Frecuencia (n° de plantas) de polen no abortados (%). **a** híbridos entre *N. ericoides* y *N. scoparia*. **b** híbridos segregantes entre *N. ericoides* y *N. scoparia*.

Cabe destacar que la diferencia entre la población híbrida (F1) y la población segregante, se encuentra en la distribución de plantas en el rango del porcentaje de granos de polen no abortadas que va del 60% al 100%. Si analizamos la distribución observamos que las plantas con un porcentaje de polen no abortados mayor al 90% en la población híbrida es el 66 % (22/33 plantas), mientras que en la progenie segregante, es 30 % (17/57

plantas) (Fig. 5a). De estos valores se desprende que la mayor cantidad de plantas en la progenie segregante se encuentra en un rango del porcentaje de granos de polen no abortados 60-90 % (Fig. 5b).

El análisis comparativo, de las tres combinaciones (2 retrocruzas y 1 endocruza), en el porcentaje de granos de polen no abortados de la población segregante, muestra que no hay diferencias significativas en los resultados con un promedio de 82.2 %, 74.59 % y 71.54 % para los cruzamientos: híbrido x *N. ericoides*, híbrido x *N. scoparia* y híbrido x híbrido respectivamente (Tabla 6).

Tabla 6: Porcentaje promedio de granos de polen no abortado agrupados por el origen de la población segregante.

Progenie segregante	Porcentaje de polen no abortado (promedio)
híbrido x <i>N. ericoides</i>	82.26468 a
híbrido x <i>N. scoparia</i>	74.59491 a
híbrido x híbrido	71.54655 a

La letra marca la diferencia no significativa según ANOVA test Tukey.

Evaluación de la variación obtenida en la progenie segregante

Todos los cruzamientos realizados para la obtención de la progenie segregante fueron exitosos, con un 100 % de producción de frutos en todos los casos. De las semillas provenientes de 5 frutos por combinación (híbrido x *N. ericoides*; híbrido x *N. scoparia* y híbrido x híbrido), se obtuvo un total de 343 plantas, de las cuales fueron seleccionadas según el porte 57 individuos (Tabla 6). La selección se realizó sobre las plantas que respondían a los tres portes fijados (Porte Erecto (PE); Porte Rastrero (PR) y Forma Compacta (FC)) solamente, el resto de las plantas con formas intermedias fueron descartadas.

Dentro de las selectas con Porte Erectos (Fig.6a), se obtuvieron 6, 8 y 7 plantas de las combinaciones híbrido x *N. ericoides*, híbrido x *N. scoparia* e híbrido x híbrido, respectivamente. Entre las de Porte Rastrero (Fig.6b) 7 plantas provinieron de los cruzamientos de retrocruza y 4 plantas de la endocruza. Finalmente en la selección para Forma Compacta (Fig.6c) la mayor cantidad de plantas se obtuvo de la retrocruza con *N. ericoides* (10 plantas), en menor cantidad de la endocruza (7 plantas) y solamente 1 planta se obtuvo de la retrocruza con *N. scoparia*.



Figura 6: Individuos selectos de la población de la progenie segregante de híbridos interespecíficos entre *N. scoparia* y *N. ericoides*. **a** Retrocruza con *N. scoparia*, tipo porte erecto. **b** Retrocruza con *N. scoparia*, tipo porte rastrero. **c** retrocruza con *N. ericoides*, tipo forma compacta. **Aumento:** Barra = 5cm.

Tabla 7: Individuos selectos según forma de la planta en estado vegetativo (n° de plantas) para cada combinación.

	Selectas/Total	Porte erecto	Porte rastrero	Forma compacta
híbrido x <i>N. ericoides</i>	23/107	6	7	10
híbrido x <i>N. scoparia</i>	13/95	8	4	1
híbrido x híbrido	21/141	7	7	7

Evaluación en estado de estaca enraizada

La primera característica evaluada fue la capacidad de los clones para enraizar, observando que en todos los casos a los quince días estaban enraizados (Fig. 7), con un porcentaje de enraizamiento superior al 80 % en todos los casos.

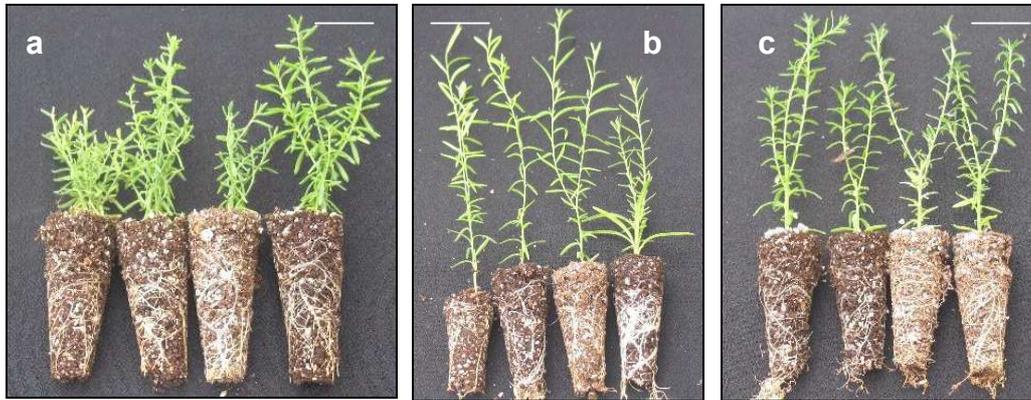


Figura 7: Estacas enraizadas de clones híbridos del género *Nierembergia*. **a** Clon 41. **b** Clon 45. **c** Clon 56. **Aumento:** Barra = 1cm.

La primera evaluación realizada de los clones selectos de la progenie segregante, mostró un aumento en el número de brotes por estacas. Las estacas provenientes de la retrocruza con *N. ericoides* presentaron el mayor promedio de brotes (4.05 brotes/estaca (Tabla 8), seguidos de la retrocruza con *N. scoparia* y la endocruza (3.3 y 2.9 brotes/plantas, respectivamente) (Tabla 8). Cabe destacar que los tres valores se encuentran, en las estacas enraizadas, por encima del promedio de brotes de las especies progenitoras con 1.6 y 1.9 (brotes/estaca) para *N. scoparia* y *N. ericoides* respectivamente (Tabla 8).

Tabla 8: Promedio de número de brotes por planta en estado de estaca enraizada en la progenie segregante de híbridos entre *N. ericoides* y *N. scoparia*.

Población	N° Brotes/estaca (promedio)
<i>N. scoparia</i> (progenitor)	1.6 a
<i>N. ericoides</i> (progenitor)	1.9 a
híbrido x híbrido (F2)	3.3 b c
híbrido x <i>N. scoparia</i> (retrocruza)	2.9 b
híbrido x <i>N. ericoides</i> (retrocruza)	4.05 c

La letra marca la diferencia no significativa según ANOVA test Tukey.
Fuente de datos Anexo IV- Tabla 2.

El promedio de las alturas en las poblaciones segregantes (11.05; 8.8 y 6.5 cm) (Tabla 9), nos muestran en los tres casos valores intermedios a los obtenidos por las especies progenitoras (27.9 y 5.5 cm) (Tabla 9).

Tabla 9: Altura promedio en estado de estaca enraizada en la progenie segregante de híbridos entre *N. ericoides* y *N. scoparia*.

Población	Altura/estaca (promedio)
<i>N. scoparia</i> (sp. progenitora)	27.9 a
<i>N. ericoides</i> (sp. progenitora)	5.5 b
híbrido x híbrido	11.05 a b
híbrido x <i>N. scoparia</i>	8.8 b
híbrido x <i>N. ericoides</i>	6.51 b

La letra marca la diferencia no significativa según ANOVA test Tukey.
Fuente de datos Anexo IV- Tabla 2.

Evaluación al inicio de floración

Analizando el diámetro de flor se observó que 30 % de las plantas presentó un diámetro en el mismo rango de las especies progenitoras (3-4 cm) (Fig. 7a). Cabe destacar que cerca de 20 % de los clones presentó un diámetro menor a 3 cm, llegando a valores extremos de 1 cm (Fig. 7a).

Los valores extremos obtenidos en el diámetro de flores en la progenie segregante no se encontraron en las especies parentales (Anexo IV- Tabla 5).

En cuanto al número de brotes, la mayor concentración se encuentra en un rango que va de 4-10 cm (Fig. 7b), con 8 clones que superan los 10 cm (Anexo IV- Tabla 5). La mayoría de los híbridos presentó un promedio de brotes mayor a los encontrados en las especies parentales (promedio = 4 *N. ericoides* y promedio = 6 *N. scoparia*) (Fig. 7b).

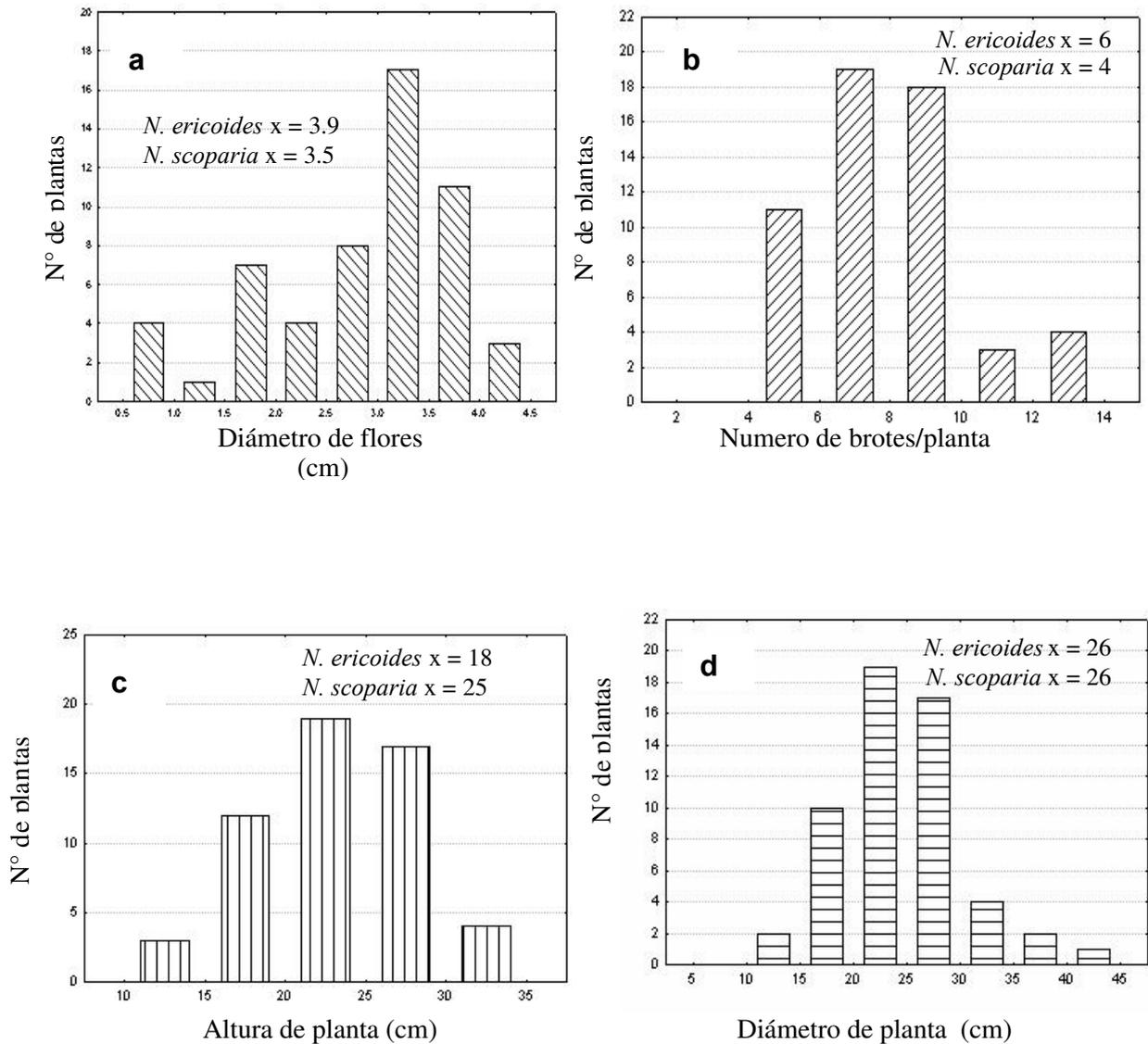


Figure 7: Características evaluadas en 57 híbridos provenientes de la progenie segregante de cruzamientos interespecíficos entre *N. scoparia* y *N. ericoides*. **a** Diámetro promedio de flores. **b** Número promedio de brotes. **c** Altura promedio de plantas. **D** Diámetro promedio de plantas. (Fuente de datos Anexo IV- Tabla 5)

X= valor promedio de los progenitores

Otros caracteres evaluados fueron altura y diámetro de planta, observando en la progenie una variabilidad que va desde 10.4 a 34.3 cm y 11.2 a 44.6 cm respectivamente (Fig. 7c, d).

La cantidad de flores promedio contadas en plena floración, arrojó que solamente 7 % de los clones superó el número de flores promedio registrado en las especies parentales (28.56 flores/planta), mientras que 68 % de los clones presentó valores promedios intermedios al rango de los progenitores (28.56 – 9.14 flores/planta) (Anexo IV- Tabla 6).

Con los datos obtenidos se realizó la selección de clones para ser evaluados en sistemas productivos comerciales con el objetivo de obtener variedades ornamentales (fig. 8) (Anexo V). Los resultados de esta selección fueron la obtención de 3 clones con flores pequeñas y porte compacto (Anexo V- Tabla 1); 2 clones con flores grandes y porte compacto (Anexo V- Tabla 2); 3 con flores medianas y porte compacto (Anexo V- Tabla 3); 2 clones de porte rastrero (Anexo V- Tabla 4) y 1 clon de porte erecto (Anexo V- Tabla 5). En todos los casos se seleccionaron materiales con abundante floración.



Figura 8: Individuos selectos para ser evaluados como variedades ornamentales de propagación agámica en plena floración. **a** Clon 15. **b** Clon 32. **c** Clon 38. **d** Clon 49. **e** Clon 50. **f** Clon 42. **g** Clon 53. **Aumento:** barra =10cm.

DISCUSIÓN

La eficiencia reproductiva y la producción de semillas en todos los frutos recolectados confirma la compatibilidad interespecífica entre *N. scoparia* y *N. ericoides*. Estos resultados indican que la hibridación interespecífica es una modalidad eficiente para generar variabilidad en el mejoramiento genético del género *Nierembergia*, teniendo en cuenta además que esta herramienta es la más utilizada para la obtención de los cultivares florales (Van Tuyl *et al.* 2002).

El análisis en el contenido de ADN por citometría de flujo mostró una ubicación intermedia de los híbridos con respecto a las especies progenitoras indicando el éxito de la hibridación entre ambas especies. Resultados semejantes fueron presentados en el género *Alstroemeria* para corroborar la hibridación interespecífica (Buitendijk *et al.* 1997). Si bien la citometría de flujo con DAPI es usada mayormente para detectar diferentes niveles de ploidía (Olsen *et al.* 2006; Sundberg *et al.* 2004; Sun *et al.* 2004), estudios sobre la sensibilidad de la citometría de flujo en trigo detectaron exitosamente estado de aneuploidía (Pfoseer *et al.* 1995; Dolezel *et al.* 1994). Estos resultados permiten inferir que el análisis por citometría de flujo de los híbridos de *Nierembergia* detectaría pérdidas o ganancias de cromosomas por desbalance en la meiosis de los híbridos. La estabilidad del ADN encontrada en los híbridos aquí analizados, reflejan un apareamiento correcto entre cromosomas homeólogos y, en consecuencia, una cercanía genética entre las especies progenitoras.

De acuerdo con los estudios obtenidos en la fertilidad de los híbridos, se observó que la generación híbrida (F1) exhibe un alto porcentaje de polen no abortado (90 %). Si bien en la generación segregante la mayoría de los clones tuvo una fertilidad mayor al 60 % se observó una disminución con respecto a la generación primogénita. Tomando en cuenta que los resultados encontrados en esta tesis sugieren que *N. scoparia* y *N. ericoides* son

especies cercanas genéticamente, esta disminución en la viabilidad del polen puede atribuirse a una depresión por endogamia (Anderson, 2005). En algunas especies la depresión por endogamia se manifiesta muy tempranamente, como es el caso de algunos híbridos interespecíficos dentro del género *Lilium*, que en la segunda generación la viabilidad de polen decrece significativamente con respecto a la generación progenitora (Anderson y Dunn, 2003)

Los resultados de la caracterización de la progenie segregante, pusieron de manifiesto importantes características ornamentales faltantes en la variación encontrada en las especies parentales.

La variabilidad encontrada en la progenie segregante permitió seleccionar 11 clones con características ornamentales sobresalientes: 3 clones con flores pequeñas y porte compacto, 2 clones con flores grandes y porte compacto, 3 con flores medianas y porte compacto, 2 clones de porte rastrero y 1 clon de porte erecto. En todos los casos se seleccionaron materiales con abundante floración.

Este estudio demuestra que en *Nierembergia* el éxito de los programas de mejoramiento tiene sus bases en el conocimiento científico, la correcta taxonomía y la minuciosa búsqueda de variabilidad genética, para poder hacer uso correcto del conjunto de tecnologías involucradas en la obtención de variabilidad y así direccionar el mejoramiento según el requerimiento del mercado.

Conclusiones y Perspectivas

Conclusiones y Perspectivas generales

En este estudio llevado a cabo en ocho especies nativas del género *Nierembergia* propuse como objetivos generales conocer la compatibilidad interespecífica entre las especies nativas de valor ornamental y obtener híbridos interespecíficos como fuente de variación en el mejoramiento. Para alcanzar estos objetivos se utilizaron diferentes metodologías: (i) Estudios filogenéticos usando como marcadores moleculares el gen *rpl14* y los espacios intergénicos (IGS) *trnK* y *trnL* del genoma del cloroplasto; (ii) Cruzamientos dirigidos entre todas las especies, aplicando polinización artificial seguida del estudio de la germinación de los granos de polen sobre el estigma y el crecimiento de los tubos polínicos a lo largo de los pistilos; esto último permitió establecer la relación Estigma-Polen/Estilo-Tubo polínico (EPET) en las combinaciones entre todas las especies; (iii) estudios del desarrollo del endosperma y del embrión en cruzamientos interespecíficos y sus recíprocos entre *N. linariaefolia*, *N. scoparia* y *N. ericoides*

Las principales conclusiones fueron las siguientes:

- El análisis filogenético reveló la formación de tres sub-clados *N. veitchii*-*N. aristata*, *N. linariaefolia*-*N. micrantha* y *N. scoparia*-*N. ericoides*
- El estudio de EPET corroboró la cercanía filogenética entre las especies integrantes de cada uno de los sub-clados arriba-mencionados, en los cruzamientos interespecíficos *N. scoparia* x *N. ericoides*; *N. aristata* X *N. veitchii* y *N. linariaefolia* x *N. micrantha* y sus recíprocos. Este resultado permite sugerir que tales especies, en las combinaciones mencionadas, constituyen padres putativos para la obtención de híbridos interespecíficos.
- La compatibilidad uni-direccional encontrada en el cruzamiento de *N. linariaefolia* x *N. micrantha*, sugiere que el crecimiento del tubo polínico podría estar asociado al

aporte nutricional del mismo por parte del estilo, y soportado por mecanismos específicos para cada especie..

- La incompatibilidad entre *N. linariaefolia* con *N. ericoides* y *N. scoparia* se expresa durante las primeras divisiones del endosperma. En las combinaciones incompatibles donde *N. linariaefolia* era utilizada como madre, se corroboró que el desarrollo del endosperma primero y del embrión después, son interrumpidos por la hiperplasia del endotelio el cual se convierte en una barrera para los nutrientes y señales provenientes de los tejidos del esporófito. En los cruzamientos incompatibles recíprocos (*N. linariaefolia* ♂), es en cambio el endosperma el que interrumpe su desarrollo en forma temprana, en tanto el endotelio continúa su crecimiento.
- Teniendo en cuenta el número cromosómico de las especies que actúan como madres en los cruzamientos incompatibles, es posible concluir que la incompatibilidad estaría dada por un desbalance en el número cromosómico del endosperma.
- Los estudios de desarrollo del endosperma y del embrión confirmaron la compatibilidad interespecífica entre *N. ericoides* y *N. scoparia*
- Los híbridos entre *N. scoparia* y *N. ericoides* que se obtuvieron directamente (es decir, sin aplicar técnicas auxiliares) confirma la compatibilidad entre ambas especies.
- La cercanía genética entre *N. scoparia* y *N. ericoides* se corrobora tanto por la estabilidad en el contenido de ADN de los híbridos como también por el alto porcentaje de fertilidad de la población híbrida.
- Al caracterizar la progenie segregante, provenientes de retrocruzas y endocruzas de híbridos interespecíficos entre *N. scoparia* y *N. ericoides*, se detectaron caracteres extremos que no se encuentran en ninguna de las dos especies parentales. De esta manera se confirma la exitosa variabilidad generada por la hibridación interespecífica.

Estos estudios contribuyen con información valiosa para ser utilizada en el delineamiento de nuevas estrategias dentro del plan de mejoramiento del género *Nierembergia* que se lleva a cabo en el Instituto de Floricultura de INTA-Castelar.

En efecto, por una parte se han obtenido materiales con interés ornamental (híbridos interespecíficos); por otra parte se ha generado información básica relativa a las relaciones filogenéticas y a la biología reproductiva, ambas involucradas en la incompatibilidad interespecífica. En los cruzamientos que resultaron incompatibles, se han podido diferenciar entre los que presentan barreras en la etapa pre-cigótica, de aquellos en los que las barreras se establecen en las primeras etapas de la endospermogénesis (post-cigóticas). Esta información valiosísima permitió detectar los cruzamientos incompatibles que se pueden recuperar usando técnicas de rescate embrionario.

Anexo I

Metodología y Materiales de Recolección

Anexo I– A Metodología de recolección, acondicionamiento y cultivo

Todos los materiales utilizados fueron recolectados desde las diferentes zonas de origen, en función de la aptitud ornamental que presentaban *in situ*.

Las características que se tomaron en cuenta para dicha selección fueron: cantidad de flores, variabilidad en tamaño y color de flor, arquitectura de las matas (porte, altura y diámetro) y época de floración.

Los materiales recolectados fueron en su mayoría estacas y semillas, y en menor medida plantas enteras. La metodología de recolección varió para cada material. Las semillas fueron recolectadas en sobre de papel. Como material vegetativo, fueron cortadas estacas de 30 a 40 cm. de las plantas seleccionadas *in situ*, y puestas inmediatamente en bolsas de nylon cerradas herméticamente, manteniendo el material a bajas temperaturas (mínima 4 °C) hasta el momento de ser enraizadas. En el caso de las plantas, fueron puestas a raíz desnuda en bolsas de nylon siguiendo la misma metodología que en el caso anterior.

La codificación del material fue realizada siguiendo las normas del Instituto de Floricultura INTA-Castelar. Cada entrada fue relacionada con un código único e irrepetible, formado de la siguiente manera; un número compuesto por el año, el mes y el día (estos últimos con codificación binaria), todo en forma corrida, seguido de una letra asociada al lugar de recolección, terminando con un número en cada lugar (Ejemplo: se realiza un viaje de recolección el día 3 de enero de 2006, se realizan dos paradas, en la primer parada se recolectan 2 entradas teniendo como código 20060103a1 y 20060103a2 respectivamente, en la segunda parada se recolecta una entrada con el código 20060103b1)

Todo el material recolectado fue acompañado por datos de: fecha, código de lugar, coordenadas, altura sobre el nivel del mar, provincia, departamento, lugar (con respecto a

la referencia más cercana), material vegetal recolectado (semillas, plantas y/o estacas), características diferenciales del material recolectado en caso de existir. La información fue incorporados a una base de datos del Instituto (BG-BASE).

El acondicionamiento del material se realizó en el Instituto de Floricultura INTA-Castelar, (34° 36´ latitud , 58° 40´ Longitud). Las plantas fueron plantadas en macetas plásticas, con un sustrato turba:tierra:pinocha (1:1:1), previa poda de la parte aérea. Las estacas fueron sumergidas en agua para promover la hidratación y posteriormente fueron pinchadas en bandejas con un sustrato de turba:perlita:vermiculita (2:1:1). En ambos casos el material fue mantenido en condiciones bajo microaspersión hasta su establecimiento, momento en el cual todas las plantas fueron llevadas bajo condiciones de invernáculo para su cultivo. Las semillas recolectadas fueron acondicionadas y tipificadas, el 10-20 % de las mismas fueron sembradas y el resto fue llevado al Banco Base de Germoplasma, para su conservación a largo plazo.

Para la siembra las semillas fueron sumergidas en ácido giberelico (100 ppm) durante 8 h, seguidamente fueron enjuagadas tres veces, la germinación se realizó en macetas con un sustrato de turba:perlita:vermiculita (2:1:1) y puestas a germinar en con temperaturas de 20-35 °C, sembrando entre 15 y 20 semillas por maceta. Las plántulas fueron trasplantadas a plug (90 celdas) con dos hojas verdaderas expandidas y mantenidas en las mismas en las mismas condiciones a las que fueron puestas para germinar. Una vez formada la base radicular fueron trasplantadas a maceta de 10 cm de diámetro y cultivados en los invernáculos del Instituto de Floricultura, INTA – Castelar.

Anexo I– B Material vegetal

Descripción del área de distribución, hábitat y origen del material recolectado de las ocho especies pertenecientes al género *Nierembergia* involucradas en el trabajo de tesis.

***N. aristata* D. Don**

Área de distribución y Hábitat: Habita en suelos arcillosos, temporariamente anegados de Brasil, Paraguay, Uruguay y Argentina, donde crece en las regiones del nordeste y centro (Cha, F, M, Ct, Ctes, Cord, ER, BA) (Cocucci, 1995)

Material recolectado: ARGENTINA. CORRIENTES, San Luis del Palomar, Arroyo El Riachuelito, 27°30'05''S, 58°34'10''W, 20 de noviembre 2002, borde arroyo zona inundable, (fl y fr), M. S. Soto (Cod. IF: **20021120d1**) (Fig. 3a).

***N. browaloides* Griseb.**

Area de distribución y Hábitat: En praderas de Argentina (únicamente ER) y Uruguay (Cocucci, 1995)

Material recolectado: ARGENTINA, ENTRE RÍOS. La Paz, Gral. Artigas a 3500 m del Arco de entrada a La Paz hacia la ruta, 30°44'22''S, 59°36'054''W, 30 agosto 2001, borde avenida, (fl y fr) M.S. Soto (Cod. IF: **20040920g1**)

***N. calycina* Hook.**

Area de distribución y Hábitat: Regiones montañosas (1700-3300 m.s.m) del noroeste de Argentina (S, T, Ct) y Bolivia (Cocucci, 1995)

Material recolectado: Argentina, ENTRE RÍOS, Concordia, camino a Pedernal, a 1.3 km de RN14, 31°39'20''S, 58° 36'054''W, 55 m, 20 septiembre 2004 (fl,fr), suelos

pesados M.S. Soto (Cod. IF: **20040920h1**); Federal, RP28 a 49 km de RN14 hacia federal, 30°55'20''S, 58°29'054''W, (fl,fr), M.S. Soto (Cod. IF: **20051214b1**)

***N. ericoides* Miers**

Area de distribución y Hábitat: Endemismo del sistema orográfico Tandil-Ventana (BA) a alturas de 200 a 900 m.s.m. (Cocucci, 1995)

Material recolectado: ARGENTINA, BUENOS AIRES. Tandil, Sierra de las Ánimas, Cantera Carvas, 20 de marzo 2002, lugar abierto, (fl y fr) I. Miyashima (Cod. IF: **20020320b2**).

***N. micrantha* Cabrera**

Area de distribución y Hábitat: habita depresiones húmedas en el sudeste de Brasil y Nordeste de Argentina. (Cocucci, 1995)

Material recolectado: ARGENTINA, MISIONES, Leandro N. Alem, sobre RP4 en dirección hacia Santa Ana ½ km. antes del cruce Rp4 y PR103, 27°25'05''S, 585°31'10''W, 143 m, 19 noviembre 2004, campo arado,(fl y fr) M. S. Soto: (Cod. IF: **20041119b1**).

***N. linariaefolia* Graham**

Area de distribución y Hábitat: *N. linariaefolia* var *linariaefolia*, en terrenos abiertos de bosque, de las PB Chaqueñas y del Espinal, en Argentina (J, S, Cha, M, Ct, T, Sgo, Cte, Cor, ER, SL). También presente en el sur de Brasil. *N. linariaefolia* var *glabriuscula*, crece en regiones montañosas (1200 a 2400m.s.m), en los faldeos orientales de Sierra de Ambato (Ct), Sierra Grande (Cord, SL) Sierra de San Luis y Cerro el morro (SL). *N. linariaefolia* var *pampeana*, entidad endémica del sudeste de LP y sitios limítrofes del sur de BA y

norte de RN. *N. lianiraeifolia* var. *pinifolioides*, endemismo de la Sierra Chica de Córdoba y afloramiento aislado del mismo sistema orográfico, en Ct, Sgo, y SL, a alturas de 500 a 1200 m.s.m. (Cocucci, 1995)

Material recolectado: *N. linariaefolia* var *linariaefolia* **ARGENTINA, ENTRE RÍOS.** Dpto. Diamante, ruta 23, Arroyo Barrancas, 12 enero 1999, borde arroyo (fl y fr) H. Kokubum (Cod. IF: **19990112-26**); Colòn, camino paralelo que sale a la derecha del Club de Pescadores, 32°30'30''S, 58°38'39''W, 16m, 20 septiembre 2000, suelos arenosos, (fl,fr) M. S. Soto (Cod. IF: **20000920f1**) (**Fig. 3c**). **CORRIENTES.** Dpto. Santo Tomé, camino entrada a Prefectura Garruchos, 28°30'30''S, 55°38'39''W, 22 noviembre 2002, borde camino, (fl y fr). J. C. Haguiwara (Cod. IF: **20021122c1**) **MISIONES.** Oberá, RN 14 a 16 km antes de Oberá viniendo de Aristóbulo del Valle, 27°21'36''S, 55°02'24''W, 26 septiembre 2001, lugar abierto borde camino, (fl y fr); M. S. Soto (Cod. IF: **20010926g1**). *N. linariaefolia* var *glabriuscula*. **ARGENTINA, CÓRDOBA.** Sierra Grande, a 31 km de Niña Paula por RN 20 hacia El Cóndor, 31°37'10''S, 64°53'17''W, 20 marzo 2003, abierto, (fr). M. S. Soto (Cod. IF: **20030320b1**) (**Fig. 3d-e**); Sierra Grande, a 1 km de RN20 camino lateral desde El Cóndor a Mina Clavero, 31°36'52''S, 64°54'42''W, 20 marzo 2003, abierto, (fl y fr) M. S. Soto (Cod. IF: **20030320F1**).

***N. scoparia* Sendtn**

Area de distribución y Hábitat: Sur de Brasil y Uruguay, y en bañados del nordeste de Argentina (Ctes,ER) (Cocucci, 1995)

Material recolectado: **ARGENTINA, ENTRE RÍOS.** Galeguaychú, Puerto Campichuelo, 32°41'21''S, 58°11'23''W, bañados a orillas del río (fl y fr). M. S. Soto (Cod. IF: **20051213a1**)

***N. veitichii* Hook**

Area de distribución y Hábitat: Se la encuentra en terrenos anegados del centro y oeste de Argentina (J,S, Ct, Sgo) (Cocucci, 1995)

Material recolectado: ARGENTINA, CATAMARCA. Cuesta del Portezuelo, RP1 km 42, 32°41'10''S, 64°59'17''W, 18 noviembre 2003, abierto, (fl y fr).J. Greppi **20031118a1** (IF) Cuesta del Portezuelo, RP1 km 42, 32°41'10''S, 64°59'17''W, 18 noviembre 2003, abierto, (fl y fr).J. Greppi (Cod. IF: **20031118a2**)

Anexo II

Secuenciación de los fragmentos de cloroplasto utilizados en el estudio filogenético

Anexo II- A: Matriz de datos de la región *rp114*.

	5	15	25	35	45	55
F. imbrica	AAGTGAGGGA	TTCGTCCATA	CTCTCGGTAA	AGTTTGGAAAG	ACCACGACTG	ATCCTGAAAAG
L. linifol	AAGTGAGGGA	TTCGTCCaTA	CTCTCGGTAA	AGTTTGGAAAG	ACCACGACTG	AGCCTGAAAAG
B. anomala	aagtgaGGGA	TTCGTCCATA	CTCTCGGTAA	AGTTTGGAAAG	ACCACGACTG	ATCCTGAAAAG
N. linaria	AAGTGAGGGA	TtCGTCCATC	CTCTCGGTAA	AGTTKGGCAG	ACCACGACTG	ATCCTGAAAAG
N. ericoid	aagTGAGggA	TTCGTCCATC	CTCTCGGTAA	AGTTGCTAAG	ACCACGACTG	ATCCTGAAAAG
N. aristat	aagtgaGgAG	TtCgTCCATC	CTCTCGGTAA	AGTTTgGAAK	ACCACGACTG	ATCCTGAAAAG
N. scopari	aagtgaggaG	TtCGcCcATC	CTCTCGKTAA	AGTTTgGAAAG	ACCACGACTG	ATCCTGAAAAG
N. browall	AAGTGAGGGA	TTCGTCCATC	CTCTCGGTAA	AGTTTGGAAAG	ACCACGACTG	ATCCTGAAAAG
N. veitich	aagtgaGGGA	TTCGTCCATC	CTCTCGGTAA	AGTTTGGAAAG	ACCACGACTG	atCCtgaACC
N. calycin	AAGTGAGGGA	TTCGTCCATC	CTCTCGGTAA	AGTTTGGAAAG	ACCACGACTG	ATCCTGAAAAG
N. micrant	aagtGAGGgA	tTCGTCCATC	CTCTCGGTAA	NGTTTgGcAG	ACCACGAYTG	ATCCTGAAAAG

	65	75	85	95	105	115
F. imbrica	GGAATGAATG	GTAAAAATAG	CATGTCGTAT	CAACGAAAAG	TTCTGAGAAT	AT-TTCATTG
L. linifol	GGAATGAATG	GTAAAAATAG	CATGTCGTAT	CAACGAAAAG	TTCTGAGAAT	AT-TTCATTG
B. anomala	GAATGAATGG	TAAAAATAGC	ATGTCGTATC	AACGAAAAGT	TCTGAGAATA	T-TTCATTGT
N. linaria	GGAATGAATG	GTAAAAATAG	CATGTCGTAT	CAACGAAAAG	TTCTGAGACT	AT-TTCATTG
N. ericoid	GGAATGAATG	GTAAAAATAK	cATGYCGTAT	CAACGAAAAG	TTCTGAGACT	ATCTTCATKG
N. aristat	GCAatGAATG	GTAAAAATAT	CCTGTCTGTAT	CAaCGAAAAG	TTCTGAGACT	AT-TTCATGG
N. scopari	GKaatGAATG	GTAAAAATaS	CATGTCgTAT	CAACGAAAAG	TTCTGAGACT	AT-TYCATTG
N. browall	GGAATGAATG	GTAAAAATAG	CATGTCGTAT	CAACGAAAAG	TTCTGAGACT	AT-TTCATTG
N. veitich	gCAATGAATG	GTAAAAATAG	CATGTCGTAT	CAACGAAAAG	TTCTGAGACT	AT-TTCATGG
N. calycin	GGAATGAATG	GTAAAAATAG	CATGTCGTAT	CAACGAAAAG	TTCTGAGACT	AT-TTCATTG
N. micrant	AGAATGAATG	GTAAAAATAG	CATGTCKTAT	CAACGAAAAG	TTCTGAGACT	AT-TTCATTG

	125	135	145	155	165	175
F. imbrica	TTCTAGATC	AATATAAAAAC	CC-----T	ATTCTAATTC	TTGGAATCTT	GG-AACGGAA
L. linifol	TTCTAGATC	GGTATAAAAAC	CG-----T	GTTAGAAT--	-----TCTT	GG-AACGGAA
B. anomala	TTCTAGATCG	GTATAAAAATT	GAAAACCGTG	TTAGAAT---	-----TATTG	G-AACGGAAC
N. linaria	TTTCGAGATC	GGTCTAAAAT	CGAAAACCGT	GTTAGAAT--	-----TCTT	GG-AACGGAA
N. ericoid	TTTCAGATC	GGTCTAAAAT	CGAAAACCGT	GTTAGAAT--	-----TCTT	GG-AACGGAA
N. aristat	TTTCGAGATC	GGTCTAAAAT	CGAAAACCGT	GTTAGAAT--	-----TCTT	GG-AACGGAA
N. scopari	TTTCGAGATC	GGTCTAAAAt	CGAAAACCGT	GTTAGAAT--	-----TCTT	GGCAACgAA
N. browall	TTTCGAGATC	GGTCTAAAAT	CGAAAACCGT	GTTAGAAT--	-----TCTT	GG-AACGGAA
N. veitich	TTTCGAGATC	GGTCTAAAAT	CGAAAACCGT	GTTAGAAT--	-----TCTT	GG-AACGGAA
N. calycin	TTTCGAGATC	GGTCTAAAAT	CGAAAACCGT	GTTAGAAT--	-----TCTT	GG-AACGGAA
N. micrant	TTTCGAGATC	GGTCTAAAAT	CRAAAACCGT	GTTAGAAT--	-----TCTT	GG-AACGGAA

	185	195	205	215	225	235
F. imbrica	CAAAATAAAG	TTGGGTCGAA	TGAATAAATG	GATAGGGCTG	CGGCTTCAAT	TAAATTATAG
L. linifol	C-CAAAAAGG	TTGGGTCGAA	TGAATAAATG	GATAGGGCTG	TGGCTTCAAT	TAAATTATAG
B. anomala	-CTAAGGGGT	TGGGTCAAAT	GAATAAATGG	ATAGGGCTGT	GGCTTCAATT	CAATTTTAGG
N. linaria	C-CTAAGGGG	TTGGGTCGAA	TGAATAAATG	GATAGGGCTG	CGGCTTCAAT	TCAATTTTAG
N. ericoid	C-CTAaGGGG	TTGGGTCgAA	TGAATAAATG	GATAGGGCTG	CGGCTTCAAT	TCAATTTTAG
N. aristat	C-CTAAGGGG	TTGGGTCGAA	TGAATAAATG	GATAGGGCTG	CGGCTTCAAT	TCAATTTTCG
N. scopari	C-CTAAGGGG	TTGGGTCGAA	TGAATAAATG	GATAGGGCTG	CSGCTTCAAT	TCAATTTTAG
N. browall	C-CTAAGGGG	TTGGGTCGAA	TGAATAAATG	GATAGGGCTG	CGGCTTCAAT	TCAATTTTAG
N. veitich	C-CTAAGGGG	TTGGGTCGAA	TGAATAAATG	GATAGGGCTG	TGGCTTCAAT	TCAATTTTCG
N. calycin	C-CTAAGGGG	TTGGGTCGAA	TGAATAAATG	GATAGGGCTG	CGGCTTCAAT	TCAATTTTAG
N. micrant	C-CTAAGGGG	TTGGGtCGAA	TGAATAAATG	GaTAGGGCTG	CGGCTTCAAT	TCAATTTTAG

	245	255	265	275	285	295
F. imbrica	GGAAAGAAAA	AGCAACGAGC	TTTTGTTCCT	AATTTGAACG	ATTCCCgATC	TAATTAGACG
L. linifol	GGAAAGAAAA	AGCAACGAGC	TTTTGTTCCT	AATTTGAATG	ATTCCCgATC	TAATTAGACG
B. anomala	GAAAGAAAAA	GCAACGAGCT	TTTTGTTCCTA	GTTTGAATGA	TTCCCgATCT	AATTAGACGT
N. linaria	GGAAAGAAAA	AGCAACGAGC	TTTTGTTCGA	AATTTGAATG	ATTCTGATC	TAATTAGACG
N. ericoid	GGAAAgAAAA	AGCAACGAGC	TTTTGTTCGA	AATTTGAATG	ATTCTGATC	TAATTAGACG

N. aristat	GGAAAGAAAA	AGCAACGCGC	TTTTGTTC	AATTGGAATG	ATTCCTGATC	TAATTAGACG
N. scopari	GGAAAGAAAA	AGCAaCGAGC	TTTTGTTCGA	AATTGGAATG	ATTCCTGATC	TAATTAGACG
N. browall	GGAAAGAAAA	AGCAACGAGC	TTTTGTTCGA	AATTGGAATG	ATTCCTGATC	TAATTAGACG
N. veitich	GGAAAGAAAA	AGCAACGAGC	TTTTGTTC	AATTGGAATG	ATTCCTGATC	TAATTAGACG
N. calycin	GGAAAGAAAA	AGCAACGAGC	TTTTGTTCGA	AATTTGAATG	ATTCCTGATC	TAATTAGACG
N. micrant	GGAAAGAAAA	ASCAACGAGC	TTTTGTTCGA	AATTGGAATG	ATTCCTGATC	TAATTAGACG

....
305	315	325	335	345	355	

F. imbrica	TTAAAAAAT	ATTAGTGCCT	GATGCGGGAA	GGATTTCTTG	TCCCATGAGC	GGATTCTCAA
L. linifol	TTAAAAATAT	ATTAGTGCCT	GATGCGGGAA	GGGTTTCTTG	TCCCATGAGT	GGATTCTCGA
B. anomala	TAAAAATAGA	TTAGTGCCCG	ATGCGGGAAAG	GGTTTCTTGT	CCCATAAGTT	GATTCTCGAT
N. linaria	TTAAAAATAG	ATTAGTGCCT	GATGCGGGAA	GGTTTCTTGT	TCCCATGAGT	GGATTCTCGA
N. ericoid	TTAAAAATAG	ATTAGTGCCT	GATGCGGGAA	GGTTTCTTGT	TCCCATGAGT	GGATTCTCGA
N. aristat	TTAAAAATAK	ATTAGTGCCT	GATGCGGGAA	GTTTTTCTTG	TCCCATGAGC	GGATTCTCGA
N. scopari	TSAAAAATAG	ATTAGTGCCT	GATGCGGGAA	GtTTTTCTtG	TCCCATGAGT	GGATTCTCGA
N. browall	TTAAAAATAG	ATTAGTGCCT	GATGCGGGAA	GGTTTCTTGT	TCCCATGAGT	GGATTCTCGA
N. veitich	TTAAAAATAG	ATTAGTGCCT	GATGCGGGAA	GTTTTTCTTG	TCCCATGAGC	GGATTCTCGA
N. calycin	TTAAAAATAG	ATTAGTGCCT	GATGCGGGAA	GGTTTCTTGT	TCCCATGAGT	GGATTCTCGA
N. micrant	TTAAAAATAG	ATTAgTGCCT	GATGCGGGAA	GGTTTYCTTG	TCCCATGAGT	GGATTCTCGA

....
365	375	385	395	405	415	

F. imbrica	TTTTTTTAAT	GAATCCTAAC	TATTGCCATT	TTCTATTATG	GAGATGTGTG	TGT-----
L. linifol	TTTTTTTAAT	GAATCCTAAC	TATTACCATT	TTCTATTATG	GAGATGTGTG	TGT-----
B. anomala	TTTTTTGAATG	AATCCTAACT	ATTACCATTT	TCTATTATGG	AGATGTGTGT	GT-----
N. linaria	TTTTTTTAAT	GAATCCTAAC	GATTACCATT	TTCTATTATG	GAGATGTGTG	TGT-----
N. ericoid	TTTTTTTAAT	GAATCCTAAC	GATTACCATT	TTCTATTATG	GAGATGTGTG	TGt-----
N. aristat	TTTTTTTAAT	GAATCCTAAC	GATTACCATT	TTCTATTATG	GAGATGKTG	TGT-----
N. scopari	TTTTTTTAAT	GAATCCTAAC	GATTACCATT	TTCTATTATG	GAGATGTGTG	TGT-----
N. browall	TTTTTTTAAT	GAATCCTAAC	GATTACCATT	TTCTATTATG	GAGATGTGTG	TGT-----
N. veitich	TTTTTTtACT	GAATCCTAAC	GATTACCATT	TTCTATTATG	GAGATGTGTG	TGT-----
N. calycin	TTTTTTTAAT	GAATCCTAAC	GATTACCATT	TTCTATTATG	GAGATGTGTG	TGT-----
N. micrant	TTTTTTTAAT	GAAYCCTAAC	GATTaCCaTT	TTCTATtATG	GAKATGTGTG	TGT-----

Anexo II-b: Matriz de datos de la región *trnK*.

	5	15	25	35	45	55
L. linifol	AGAAGAAACA	GTATATTGAT	AACGAAAGTT	TTTTCCGAAG	TCAAAAGAGC	GATTAGGTTG
B. anomala	AGAAGAAACA	GTATATTGAT	AAAGAAAGTT	TTTTCCGAAG	TCAAAAGAGC	GATTAGGTTG
F. imbrica	AGAAGAAACA	KTaTATTGAT	AAAgAAAGTT	TTTTCCGAAG	TCAAAAGAGC	GATTAGGTTG
N. linaria	AGAAGAAAGA	GTATATTGAT	CAAGAAAGTT	TTTTCCGAAG	TCAAAAGAGC	GATTAGGTTG
N. ericoid	AGAAGAAAGA	GTATATTGAT	CAAGAAAGTT	TTTTCCGAAG	tCAAaAGAgC	GATTAGGTTG
N. aristat	AgAAGAAAGA	gTAtATTGaT	CaagaaagtT	TTTTCCgAAG	TCaAAAGAGC	GatTAGGTTG
N. scopari	AGAAGAAAGA	GTATATTGAT	CAAGAAAGTT	TTTTCCGAAG	TCAAAAGAGC	GATTAGGTTG
N. browall	AGAAGAAAGA	GTATATTGAT	CAAgAAAGTT	TTTTCCGAAG	TCAAAAGAGC	GATTAGGTTG
N. veitich	AGAAGAAAGA	GTAGATTGAT	CAAGAAAGTT	TTTTCCGAAG	TCAAAAGAGC	GATTAGGTTG
N. calycin	AgAAGAAAGA	GTATATTGAT	CAAGAAAGTT	TTTTCCGAAG	TCAAAAGAGC	GATTAGGTTG
N. micrant	AgAAAAAAGA	GTATATTGAT	CaAKAAAGTT	TTTTCCGAAG	TCAAAAGAGC	GATTAGGTTG

	65	75	85	95	105	115
L. linifol	AAAAAATAAA	~GGATTCTA	ACCATCTTAT	TATCCTATAA	CACTATAACA	CAGACCAATT
B. anomala	AAAAAATAAA	~GGATTCTA	ACCATCTTAT	TATCCTATAA	CACTATAACA	TAGACCAATT
F. imbrica	AAAAAATAAA	~GGATTCTA	ACCATCTTAT	TATCCTATAA	CACTATAACA	TAGACCAATT
N. linaria	AAAAAATAAA	~GGATTTCGA	ACCATCTTCT	TATCCTATAA	CATTATAACA	TAGACCAATT
N. ericoid	AAAAAATAAA	~GGATTGCGA	ACCATCTTCT	TATCCTATAA	CaTATAACA	TAGACCAATT
N. aristat	aAAAAATAAA	AGGATTTCGA	ACCATCTTCT	TATCCTATAA	CATTATAACA	TAGACCAATT
N. scopari	AAAAAATAAA	~GGATTGCGA	ACCATCTTCT	TATCCTATAA	CATTATAACA	TAGACCAATT
N. browall	AAAAAATAAA	~GGATTTCGA	ACCATCTTCT	TATCCTATAA	CATTATAACA	TAGACCAATT
N. veitich	AAAAAATAAA	~GGATTTCGA	ACCATCTTCT	TATCCTATAA	CaTATAACA	TAGACCAATT
N. calycin	AAAAAATAAA	~GGATTTCGA	ACCATCTTCT	TATCCTATAA	CATTATAACA	TAGACCAATT
N. micrant	AAAAAATAAA	~GGATTTCGA	ACCATCTTCT	TATCCTATAA	CATTATAACA	TAGACCAATT

	125	135	145	155	165	175
L. linifol	AAATGAAAGG	AAAAGG----	GACATGATAG	AGAATCCGTT	GAGAAGTTTA	CCTGTATCCA
B. anomala	AAATGAAACG	AAAAAG----	GAGATGATAG	AGAATCCGTT	GATAAGTTTA	CCTGTATCCA
F. imbrica	AAATGAAACG	AAAAACAAA	GAGATGATAG	AGAATCCGTT	GAGAAGTTTA	CCTGTATCCA
N. linaria	CAATGAAAGG	AAAAAA----	GAGATGWTAG	AGAATCCGTT	GAGAAGTTTA	CCTGTATCCA
N. ericoid	CAATGAAACG	AAAAAA----	GAGATGATAG	AGAATCCGTT	GAGAAGTTTA	CCTGTATCCA
N. aristat	CAATGAAAGG	AGAAAA----	AAGATGATAG	AGAATCCGTT	GAGAAGTTTA	CCTGTATCCA
N. scopari	CAATGAAACG	AAAAAA----	GAGATGATAG	AGAATCCGTT	GAGAAGTTTA	CCTGTATCCA
N. browall	CAATGAAACG	AAAAAA----	GAGATGATAG	AGAATCCGTT	GAGAAGTTTA	CCTGTATCCA
N. veitich	CAATGAAAGG	AGAAAA----	-AGATGATAG	AGAATCCGTT	GAGAAGTTTA	CCTGTATCCA
N. calycin	TAATGAAACG	AAAAAA----	GAGATGATAG	AGAATCCGTT	GAGAAGTTTA	CCTGTATCCA
N. micrant	CAATGAAAGG	AAAAAA----	GAGATGATAG	AGAATCCGTT	GAGAAGTTTA	CCTGTATCCA

	185	195	205	215	225	235
L. linifol	AGGTATCTAT	TCATACTATA	ATACTTTGTT	TTAATTGTAT	CGCACTATGT	ATCATTTGAT
B. anomala	AGGTATCTAT	TCTTACTATA	ATACTTTGTT	TTAACTGTAT	CGCACTATGT	ATCATTTGAT
F. imbrica	AAGTATCTAT	TCTTACTATA	ATACTTTGTT	TTAGCTGTAT	CGCACTATGT	ATCATTTGAT
N. linaria	AGGTATCTAT	TCTGATTAGA	CTACTTTGTT	TTAACTCTAT	CGCACTATGT	ATCATTTGAT
N. ericoid	AGGTATCTAT	TCTGACTAGA	CTACTTTGTT	TTAACTCTAT	CGCACTATGT	ATCATTTGAT
N. aristat	AGGTATCTAT	TCTGACTAGA	CTACTTTGTT	TTAACTCTAT	CGCACTATGT	ATCATTTGAT
N. scopari	AGGTATCTAT	TCTGACTAGA	CTACTTTGTT	TTAACTCTAT	CGCACTATGT	ATCATTTGAT
N. browall	AGGTATCTAT	TCTGACTAGA	CTACTTTGTT	TTAACTCTAT	CGCACTATGT	ATCATTTGAT
N. veitich	AGGTATCTAT	TCTGACTAGA	CTACTTTGTT	TTAACTCTAT	CGCACTATGT	ATCATTTGAT
N. calycin	AGGTATCTAT	TCTGACTAGA	CTACTTTGTT	TTAACTCTAT	CGCACTATGT	ATCATTTGAT
N. micrant	AGGTATCTAT	TCTGACTAGA	CTACTTTGTT	TTAACTCTAT	CGCACTATGT	ATCATTTGAT

	245	255	265	275	285	295
L. linifol	AACCCTCAAA	ATCTTCCATC	TTTGGTTCAA	ATCGAATTTT	AAATGGAAGA	AATCCAAAGA
B. anomala	ACCCCTCCCA	ATCTTCCATC	TTTGGTTCAA	ATCGAATTT-	AAATGGAAGA	AATCCAAAGA
F. imbrica	AACCCTCAAA	ATCTTCCATC	TTTGGTTCAA	ATTGAATTTT	AAATGGAAGA	AATCCAAAGA
N. linaria	AaCCCTCCCA	ATCTTCCATC	TTTGGTTCAA	ATCGAATTTT	AAATGGAAGA	AATCCAAAGa
N. ericoid	AACCCCTCCCA	ATCTTCCATC	TTTGGTTCAA	ATCGAATTTT	AAATGGAAGA	AATCCAAAGA

N. aristat	AACCCTCCCA	ATCTTCCATC	TTTGGTTCAA	CTCGAATTTT	AAATGGAAGA	AATCCAAAGA
N. scopari	AACCCTCCCA	ATCTTCCATC	TTTGGTTCAA	ATCGAATTTT	AAATGGAAGA	AATCCAAAGA
N. browall	AACCCTCCCA	ATCTTCCATC	TTTGGTTCAA	ATCGAATTTT	AAATGGAAGA	AATCCAAAGA
N. veitich	AACCCTCCCA	ATCTTCCATC	TTTGGTTCAA	CTCGAATTTT	AAATGGAAGA	AATCCAAAGA
N. calycin	AACCCTCCCA	ATCTTCCATC	TTTGGTTCAA	CTCGAATTTT	AAATGGAAGA	AATCCAAAGA
N. micrant	AACCCTCCCA	ATCTTCCATC	TTTGGTTCAA	ATCGAATTTT	AAATGGAAGA	AATCCAAAGA

	305	315	325	335	345	355
L. linifol	TATTTACAGC	CAGATAGATC	GCAACAACAC	AACTTCCTAT	ATCCACTTAT	CTTTCAGGAG
B. anomala	TATTT-cAGC	CGGATAGATC	GCACCaACAC	ACNTTCCTAT	ATCC-CTWAT	CTTTCAGGAG
F. imbrica	TATTTACAGC	CAGATAAATC	GCAACAACAC	AACTTCCTAT	ATCCACTTAT	CTTTCAGGAG
N. linaria	TATTTACaGc	CAGATAGATC	GCAACAAGAC	AACTTCCTAT	ATCCACTTAT	CTTTCAGGAG
N. ericoid	TATTTACAGC	CAGATAGATC	GCACCAAGAC	AACTTCCTAT	ATCCACTTAT	CTTTCAGGAG
N. aristat	TATTTACAGC	CAGATCGATC	GCAACAAGAC	AACTTCCTAT	ATCCACTTAT	CTTTCAGGAG
N. scopari	TATTTACAGC	CAGATAGATC	GCACCAAGAC	AACTTCCTAT	ATCCACTTAT	CTTTCAGGAG
N. browall	TATTTACAGC	CAGATAGATC	GCAACAAGAC	AACTTCCTAT	ATCCACTTAT	CTTTCAGGAG
N. veitich	TATTTACAGC	CAGATCGATC	GCAACAAGAC	AACTTCCTAT	ATCCACTTAT	CTTTCAGGAG
N. calycin	TATTTACAGC	CAGATAGATC	GCAACAAGAC	AACTTCCTAT	ATCCACTTAT	CTTTCAGGAG
N. micrant	TATTTACAGC	CAGATAGATC	GCAACAAGAC	AACTTCCTAT	ATCCACTTAT	CTTTCAGGAG

	365	375	385	395	405	415
L. linifol	TATATTTATG	CACTTGCTCA	TGATCATGGT	TTAAATAGGT	CGATTTTGTT	GGAAAATCCT
B. anomala	TATATTTATG	CACTTGCTCA	TGATCATGGT	TTAA-TAGGT	CGATTTTGTT	GGAAAATCCT
F. imbrica	TATATTTATG	CACTTGCTCA	TGATCATGGT	TTAAATAGGT	CGGTTTTGTT	GGAAAATCCT
N. linaria	TATATTTATG	CACTTGCTCA	GGATCATGCT	YTAAATCGGT	CGATTTTGTT	GGAAAATCCT
N. ericoid	TATATTTATG	CACTTGCTCA	GGATCATGCT	TTAAATCGGT	CGATTTTGTT	GGAAAATCCT
N. aristat	TATATTTATG	CACTTGCTCA	GGATCATGCT	TTAAATCGGT	CGATTTGGTT	GGAAACTCCT
N. scopari	TATATTTATG	CACTTGCTCA	GGATCATGCT	TTAAATCGGT	CGATTTTGTT	GGAAAATCCT
N. browall	TATATTTATG	CACTTGCTCA	GGATCATGCT	TTAAATCGGT	CGATTTTGTT	GGAAAATCCT
N. veitich	TATATTTATG	CACTTGCTCA	GGATCATGCT	TTAAATCGGT	CGATTTGGTT	GGAAACTCCT
N. calycin	TATATTTATG	CACTTGCTCA	GGATCATGCT	TTAAATCGGT	CGATTTTGTT	GGAAAATCCT
N. micrant	TATATTTATG	CACTTGCTCA	GGATCATGCT	TTAAATCGGT	CGATTTTGTT	GGAAAATCCT

	425	435	445	455	465	475
L. linifol	GGTTATAACA	ATAAATTGAG	TTTCCTAATT	GTGAAACGTT	TAATTACTCG	AATGTATCAA
B. anomala	GGTTCTAACA	ATAAATTGAG	TTTCCTAATT	GTGAAACGTT	TAATTACTCG	AATGTATCAA
F. imbrica	GGTTATAACA	ATAAATTAG	TTTCCTAATT	GTGAAACGTT	TAATTACTCG	AATGTATCAA
N. linaria	GGTTATAACA	ATAAATTCAG	TTTCCTAATT	GTGAAACGTT	TAATTCCTCG	AATGTCTCAA
N. ericoid	GGTTATAACA	ATAAATTCAG	TTTCCTAATT	GTGAAACGTT	TAATTCCTCG	AATGTCTCAA
N. aristat	GGTTATAACA	ATAAATTCAG	TTTCCTAATT	GTGAAACGTT	TAATTCCTCG	AATGTCTCAA
N. scopari	GGTTATAACA	ATAAATTCAG	TTTCCTAATT	GTGAAACGTT	TAATTCCTCG	AATGTCTCAA
N. browall	GGTTATAACA	ATAAATTCAG	TTTCCTAATT	GTGAAACGTT	TAATTCCTCG	AATGTCTCAA
N. veitich	GGTTATAACA	AAAAATTCAG	TTTCCTAATT	GTGAAACGTT	TAATTCCTCG	AATGTCTCAA
N. calycin	GGTTATAACA	ATAAATTCAG	TTTCCTAATT	GTGAAACGTT	TAATTCCTCG	AATGTCTCAA
N. micrant	GGTTATAACA	ATAAATTCAG	TTTCCTAATT	GTGAAACGTT	TAATTCCTCG	AATGTCTCAA

	485	495	505	515	525	535
L. linifol	CAGAATCATT	TTCTTATTTT	GACTAATGAT	TCTAACAAAA	ATCCTTTTTT	GGGGTGAAC
B. anomala	CAGAATCATT	TTCTTATTTT	GACTAATGAT	TCTAACAAAA	ATCCTTTTTT	GAGGTGGAAC
F. imbrica	CAGAATCATT	TTCTTATTTT	TACTAATGAT	TCTAACAAAA	ATCCATTTTT	GGGGTGAAC
N. linaria	CAGAATCATT	TTCTTATTTT	GACTAATGAT	TYGAATCCAA	ATCCTTTTTT	GAGGTCTACC
N. ericoid	CAGAATCATT	TTCTTATTTT	GACTAATGAT	TCTAATCAAA	ATCCTTTTTT	GAGGTCTACC
N. aristat	CAGAATCATT	TTCTTATTTT	GACTAATGAT	TCTAATCAAA	ATCCTTTTTT	GAGGTGGAAC
N. scopari	CAGAATCATT	TTCTTATTTT	GACTAATGAT	TCTAATCAAA	ATCCTTTTTT	GAGGTCTACC
N. browall	CAGAATCATT	TTCTTATTTT	GACTAATGAT	TCTAATCAAA	ATCCTTTTTT	GAGGTCTACC
N. veitich	CAGAATCATT	TTCTTATTTT	GACTAATGAT	TCTAATCAAA	ATCCTTTTTT	GAGGTGGAAC
N. calycin	CAGAATCATT	TTCTTATTTT	GACTAATGAT	TCTAATCAAA	ATCCTTTTTT	GCGGTCTAAC
N. micrant	CAGAATCATT	TTCTTATTTT	GACTAATGAT	TCTAATCAAA	ATCCTTTTTT	GAGGTCTACC

	545	555	565	575	585	595
L. linifol	AAGAGTTTGT	ATTCTCAAAT	GATATCAGAG	GGGTTTGCAT	TTATTGTGGA	AATTCGGTTT
B. anomala	ACGAGTTTGT	ATTCTCAAAC	GATATCAGAG	GGTTTTGCAT	TTATTGTGGA	AATTCGGTTT
F. imbrica	AAGAGTTTGT	ACTCTCAAAT	GATATCAGAG	GTATTTGCAT	TTATTGTGGA	AATTCGGTTT

N. linaria	AAGGGTTTCT	ATTCTCAAAT	GATATCAGAG	GGTTTTACAT	TTATTGTGGA	AATTC CCTTT
N. ericoid	AAGGGTTTCT	ATTCTCAAAT	GATATCAGAG	GGTTTTACAT	TTATTGTGGA	AATTC CCTTT
N. aristat	AAGGGTTTCT	ATTCTCAAAT	GATATCAGAG	GGTTTTCCAT	TTATTGTGGA	AATTC CCTTT
N. scopari	AAGGGTTTCT	ATTCTCAAAT	GATATCAGAG	GGTTTTACAT	TTATTGTGGA	AATTC CCTTT
N. browall	AAGGGTTTCT	ATTCTCAAAT	GATATCAGAG	GGTTTTACAT	TTATTGTGGA	AATTC CCTTT
N. veitich	AAGGGTTTCT	ATTCTCAAAT	GATATCAGAG	GGTTTTCCAT	TTATTGTGGA	AATTC CCTTT
N. calycin	AAGGGTTTCT	ATTCTCAAAT	GATATCAGAG	GGTTTTACAT	TTATTGTGGA	AATTC CCTTT
N. micrant	AAGGGTTTCT	ATTCTCAAAT	GATATCAGAG	GGTTTTACAT	TTATTGTGGA	AATTC CCTTT

	605	615	625	635	645	655
L. linifol	TCTCTACGAT	TAAGATCTTC	TTTATCTTCT	GTAGAAGGCA	AAAAGATTTT	CAAATCTCAT
B. anomala	TCTCTACGAT	TAATATCTTC	TTTATCTTCT	GTAGAAGGCA	AAAAGATTTT	AAAATCTCAG
F. imbrica	TCTCTACGAT	TAATATCTTC	TTTATCTTCT	TTAGAAGGCA	AAAATATTTT	AAAATCTCAT
N. linaria	TCTCTAGGCT	TCATATCTTC	TTTATCTTCT	GTAGAAGGCA	AAAAGATTTT	GAAATCTCCT
N. ericoid	TCTCTACGCT	TCATATCTTC	TTTATCTTCT	GTAGAAGGCA	AAAAGATTTT	GAAATCTCAT
N. aristat	TCTCTACGCT	TCATATCTTC	TTTATCTTCT	GGAGAAGGCA	AAAAGATTTT	CAAATCTCAT
N. scopari	TCTCTACGCT	TCATATCTTC	TTTATCTTCT	GTAGAAGGCA	AAAAGATTTT	GAAATCTCAT
N. browall	TCTCTACGCT	TCATATCTTC	TTTATCTTCT	GTAGAAGGCA	AAAAGATTTT	GAAATCTCAT
N. veitich	TCTCTACGCT	TCATATCTTC	TTTATCTTCT	GGAGAAGGCA	AAAAGATTTT	CAAATCTCAT
N. calycin	TCTCTACGCT	TCATATCTTC	TTTATCTTCT	GTAGAAGGCA	AAAAGATTTT	CAAATCTCAT
N. micrant	TCTCTACGCT	TCATATCTTC	TTTATCTTCT	GTAGAAGGCA	AAAAGATTTT	GAAATCTCCT

	665	675	685	695	705	715
L. linifol	AATTTACGAT	CAATTCATTC	AACATTTCCCT	TTTTTAGAGG	ACAATTTTTTC	ACATCTAAAT
B. anomala	AATTTACGAT	CAATTCATTC	AATATTTCCCT	TTTTTAGAGG	ACAATTTTTGC	ACATCTAAAT
F. imbrica	AATTTACGAT	CAATTCATTC	AACATTTCCCT	TTTTTAGAGG	ACAATTTTTTC	ACATCTAAAT
N. linaria	AATTTACGAT	CCATTCATTC	AACATTTCCCT	TTTTTAGAGG	ACCATTTTTGC	ACATCTAAAT
N. ericoid	AATTTACGAT	CCATTCATTC	AACATTTCCCT	TTTTTAGAGG	ACAATTTTTGC	ACATCTAAAT
N. aristat	AATTTACGAT	CCATTCATTC	AACATTTCCCT	TTTTTAGAGG	ACAATTTTTGC	ACATCTAAAT
N. scopari	AATTTACGAT	CCATTCATTC	AACATTTCCCT	TTTTTAGAGG	ACAATTTTTGC	ACATCTAAAT
N. browall	AATTTACGAT	CCATTCATTC	AACATTTCCCT	TTTTTAGAGG	ACAATTTTTGC	ACATCTAAAT
N. veitich	AATTTACGAT	CCATTCATTC	AACATTTCCCT	TTTTTAGAGG	ACAATTTTTGC	ACATCTAAAT
N. calycin	AATTTACGAT	CCATTCATTC	AACATTTCCCT	TTTTTAGAGG	ACAATTTTTGC	ACATCTAAAT
N. micrant	AATTTACGAT	CCATTCATTC	AACATTTCCCT	TTTTTAGAGG	ACCATTTTTGC	ACATCTAAAT

	725	735	745	755	765	775
L. linifol	TATGTATTAG	AGATACTAAT	ACCCTACCCC	GTTTCATCTGG	AAATCTTGGT	TCAAACCTCTT
B. anomala	TATGTATTGG	AGATACTAAT	ACCTTACCCC	GTTTCATCTGG	AAATCTTGGT	TCAAACCTCTT
F. imbrica	TATGTATTAG	AGATACTAAT	ACCCTACCCC	GTTTCATCTGG	AAATCTTGGT	TCAAACCTCTT
N. linaria	TATGGATTTCG	AGATAGTAAT	ACCTTACCCC	CTTCATCTGG	AAATCTTGGT	TCAAACCTCTT
N. ericoid	TATGGATTAG	AGATAGTAAT	ACCTTACCCC	GTTTCATCTGG	AAATCTTGGT	TCAAACCTCTT
N. aristat	TATGGATTAG	AGATAGTAAT	ACCTTACCCC	GTTTCATCTGG	AAATCTTGGT	TCAAACCTCTT
N. scopari	TATGGATTAG	AGATAGTAAT	ACCTTACCCC	GTTTCATCTGG	AAATCTTGGT	TCAAACCTCTT
N. browall	TATGGATTAG	AGATAGTAAT	ACCTTACCCC	GTTTCATCTGG	AAATCTTGGT	TCAAACCTCTT
N. veitich	TATGGATTAG	AGATAGTAAT	ACCTTACCCC	GTTTCATCTGG	AAATCTTGGT	TCAAACCTCTT
N. calycin	TATGGATTAG	AGATAGTAAT	ACCTTACCCC	GTTTCATCTGG	AAATCTTGGT	TCAAACCTCTT
N. micrant	TATGGATTTCG	AGATAGTAAT	ACCTTACCCC	CTTCATCTGG	AAATCTTGGT	TCAAACCTCTT

	785	795	805	815	825	835
L. linifol	CGCTATTGGG	TAAAAGATGC	CTCTTCTTTA	CATTTATTAC	GATTCCTTCT	CCACGAATAT
B. anomala	CGCTATTGGG	TAAAAGATGC	CTCTTCTTTA	CATTTATTAC	GATTCCTTCT	CCACGAATGT
F. imbrica	CGCTATTGGG	TAAAAGATGC	CTCTTCTTTA	CATTTATTAC	GATTCCTTCT	CCACGAATAT
N. linaria	CGCTATTGGG	TAAAAGACGC	CTCTTCTTTA	CATTTATTAC	GATTCCTTCT	CCACGAATAT
N. ericoid	CGCTATTGGG	TAAAAGACGC	CTCTTCTTTA	CATTTATTAC	GATTCCTTCT	CCACGAATAT
N. aristat	CGCTATTGGG	TAAAAGATGC	CTCTTCTTTA	CATTTATTAC	GATTCCTTCT	CCACGAATAT
N. scopari	CGCTATTGGG	TAAAAGACGC	CTCTTCTTTA	CATTTATTAC	GATTCCTTCT	CCACGAATAT
N. browall	CGCTATTGGG	TAAAAGACGC	CTCTTCTTTA	CATTTATTAC	GATTCCTTCT	CCACGAATAT
N. veitich	CGCTATTGGG	TAAAAGATGC	CTCTTCTTTA	CATTTATTAC	GATTCCTTCT	CCACGAATAT
N. calycin	CGCTATTGGG	TAAAAGATGC	CTCTTCTTTA	CATTTATTAC	GATTCCTTCT	CCACGAATAT
N. micrant	CGCTATTGGG	TAAAAGACGC	CTCTTCTTTA	CATTTATTAC	GATTCCTTCT	CCACGAATAT

	845	855	865	875	885	895
L. linifol	TGGAATTTGA	ATAGTCTTAT	TACTCCAAAG	AAGCCCGCTT	ACTCCTTTTC	AAAAAAAAC

B. anomala	TGGAATTGGA	CTAGTCTTAT	TCCTCTAAAG	AAGCCCGCTT	A-----TTC	AAAAAAAAAC
F. imbrica	TGGAATTGGA	ATAGTTTTAT	TACTCCTAAAG	AAGCCCGGTT	ACTCCTTTTC	AAAAAAAAAT
N. linaria	TGGAATTGGA	ATAGTCTTAT	TACTCTAAAG	AAGCCCGCGG	ACTCCCTTTTC	CAAAAAAAAAAC
N. ericoid	TGGAATTGGA	ATAGTCTTAT	TACTCTAAAG	AAGCCCGCTG	ACTCCCTTTTC	CAAAAAAAAAAC
N. aristat	TGGAATTGGA	ATAGTCTTCT	TACTCTCAAG	AAGCCCGCTG	ACTCCCTTTTC	AAAAAAAAAAC
N. scopari	TGGAATTGGA	ATAGTCTTAT	TACTCTAAAG	AAGCCCGCTG	ACTCCCTTTTC	CAAAAAAAAAAC
N. browall	TGGAATTGGA	ATAGTCTTAT	TACTCTAAAG	AAGCCCGCTG	ACTCCCTTTTC	CAAAAAAAAAAC
N. veitich	TGGAATTGGA	ATAGTCTTCT	TACTCTCAAG	AAGCCCGCTG	ACTCCCTTTTC	AAAAAAAAAAC
N. calycin	TGGAATTGGA	ATAGTCTTAT	TACTCTAAAG	AAGCCCGCTG	ACTCCCTTTTC	AAAAAAAAAAC
N. micrant	TGGAATTGGA	ATAGTCTTAT	TACTCTAAAG	AAGCCCGCGG	ACTCCCTTTTC	CAAAAAAAAAAC

....
905	915	925	935	945	955	

L. linifol	CAAAGATTCT	TCTTTTTCTT	ATATAATTCT	TATGTATATG	AGTGCGAATC	GACTTTCGTC
B. anomala	CAAAGATTCT	TCTCCTTCTT	ATATAATTCT	TATGTATATG	AATGGGAATC	CACTTTCGTC
F. imbrica	AAAAGATTCT	TCTTCTTCTT	ATATAATTCT	TATGTATATG	AATGGGAATC	CACTTTCGTC
N. linaria	CAAAGATTCT	TCTTCTTCTT	ATATAATTCT	TATCTATATG	AATGGGAATC	CACTTTCGTC
N. ericoid	CAAAGATTCT	TCTTCTTCTT	ATATAATTCT	TATCTATATG	AATGGGAATC	CACTTTCGTC
N. aristat	CAAAGATTCT	TCTTCTTCTT	ATATAATTCT	TATCTATATG	AATGGGAATC	CACTTTCGTC
N. scopari	CAAAGATTCT	TCTTCTTCTT	ATATAATTCT	TATCTATATG	AATGGGAATC	CACTTTCGTC
N. browall	CAAAGATTCT	TCTTCTTCTT	ATATAATTCT	TATCTATATG	AATGGGAATC	CACTTTCGTC
N. veitich	CAAAGATTCT	TCTTCTTCTT	ATATAATTCT	TATCTATATG	AATGGGAATC	CACTTTCGTC
N. calycin	CAAAGATTCT	TCTTCTTCTT	ATATAATTCT	TATCTATATG	AATGGGAATC	CACTTTCGTC
N. micrant	CAAAGATTCT	TCTTCTTCTT	ATATAATTCT	TATCTATATG	AATGGGAATC	CACTTTCGTC

....
965	975	985	995	1005	1015	

L. linifol	TTTCTACGGA	ACCAATCTTC	TCATTTCCGA	TCAACATCTT	TTGGAGCCTT	TCTTGAACGA
B. anomala	TTTCTACGGA	ACCAATCTTC	TCATTTCCGA	TCAACATCCT	TTGGAGCCTT	TCTTGAACGA
F. imbrica	TTTCTGCGGA	ACCAATCTTC	TCATTTACGA	TCAACATCTT	TTGGAGCCTT	TCTTGAACGA
N. linaria	TTTCTACGGA	ACCAATCTTC	TCATTTCCGA	TCAACATCCT	TTGGAGCCTT	TCTTGAACGA
N. ericoid	TTTCTACGGA	ACCAATCTTC	TCATTTCCGA	TCAACATCCT	TTGGAGCCTT	TCTTGAACGA
N. aristat	TTTCTACGGA	ACCAATCTTC	TCATTTCCGA	TCAACATCCT	TTGGAGCCTT	TCTTGAACGA
N. scopari	TTTCTACGGA	ACCAATCTTC	TCATTTCCGA	TCAACATCCT	TTGGAGCCTT	TCTTGAACGA
N. browall	TTTCTACGGA	ACCAATCTTC	TCATTTCCGA	TCAACATCCT	TTGGAGCCTT	TCTTGAACGA
N. veitich	TTTCTACGGA	ACCAATCTTC	TCATTTCCGA	TCAACATCCT	TTGGAGCCTT	TCTTGAACGA
N. calycin	TTTCTACGGA	ACCAATCTTC	TCATTTCCGA	TCAACATCCC	TTGGAGCCTT	TCTTGAACGA
N. micrant	TTTCTACGGA	ACCAATCTTC	TCATTTCCGA	TCAACATCCT	TTGGAGCCTT	TCTTGAACGA

....
1025	1035	1045	1055	1065	1075	

L. linifol	ATCTATTTCT	ATGGAAAAGAT	AGAACGTCTT	GTAGAAGTCT	TTACTAAGGA	TTTGCAGGGC
B. anomala	ATCTATTTCT	ATGGAAAAAT	AGAACGTCTT	ATCGAAGTCT	TTACTAAGGA	TTTTCAGGTT
F. imbrica	ATCTATTTCT	ATGGAAAAAT	AGAACGTCTT	GTCGAAGTCT	TTGCTAAGGA	TTTTCAGGTT
N. linaria	ATCTATTTCT	ATGGAAAAAT	AGAACGTCTT	ATCGAAGTCT	TTCTCAGGA	TTGTCAGGTT
N. ericoid	ATCTATTTCT	ATGGAAAAAT	AGAACGTCTT	ATAGAAGTCT	TTACTCAGGA	TTGTCAGGTT
N. aristat	ATCTCTTTCT	ATGGAAAAAT	AGAACGTCTT	ATAGAAGTCT	TTCTCAGGA	TTGTCAGGTT
N. scopari	ATCTATTTCT	ATGGAAAAAT	AGAACGTCTT	ATAGAAGTCT	TTACTCAGGA	TTGTCAGGTT
N. browall	ATCTATTTCT	ATGGAAAAAT	AGAACGTCTT	ATAGAAGTCT	TTACTCAGGA	TTGTCAGGTT
N. veitich	ATCTCTTTCT	ATGGAAAAAT	AGAACGTCTT	ATAGAAGTCT	TTCTCAGGA	TTGTCAGGTT
N. calycin	ATCTATTTCT	ATGGAAAAAT	GGAACGTCTT	ATAGAAGYCT	TTACTCAGGA	TTCTCAGGTT
N. micrant	ATCTATTTCT	ATGGAAAAAT	AGAACGTCTT	ATCGAAGTCT	TTCTCAGGA	TTGTCAGGTT

....
1085	1095	1105	1115	1125	1135	

L. linifol	ACCCTATGGT	TATTTAAGGA	CCCTTTACTG	CATTATGTTA	GGTATCAAGG	AAAATCAATT
B. anomala	ACCCTATGGT	TATTTAAGGA	CTCTTTCTG	CATTATGTTA	GGTATCAAGG	AAAATCAATT
F. imbrica	ACCCTATGGT	TATTTAAGGA	CCCTTTCTG	CATTATGTTA	GGTATCAAGG	AAAATCAATT
N. linaria	ACCCTATGGT	TATTTAAGGA	GCCTTTCTG	CATTATGTTA	GGTATCAAGG	AAAATTCATT
N. ericoid	ACCCTATGGT	TATTTAAGGA	GCCTTTCTG	CATTATGTTA	GGTATCAAGG	AAAATTCATT
N. aristat	ACCCTATGGT	TATTTAAGGA	GCCTTTCTG	CATTATGTTA	GGTATCAAGG	AAAATTCATT
N. scopari	ACCCTATGGT	TATTTAAGGA	GCCTTTCTG	CATTATGTTA	GGTATCAAGG	AAAATTCATT
N. browall	ACCCTATGGT	TATTTAAGGA	GCCTTTCTG	CATTATGTTA	GGTATCAAGG	AAAATTCATT
N. veitich	ACCCTATGGT	TATTTAAGGA	GCCTTTCTG	CATTATGTTA	GGTATCAAGG	AAAATTCATT
N. calycin	ACCCTATGGT	TATTTAAGGA	GCCTTTCTG	CATTATGTTA	GGTATCAAGG	AAAATTCATT
N. micrant	ACCCTATGGT	TATTTAAGGA	GCCTTTCTG	CATTATGTTA	GGTATCAAGG	AAAATTCATT

....
-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------

	1145	1155	1165	1175	1185	1195
L. linifol	CTGGCTTCAA	AGGGGACGCT	TACTTTGATG	AATAAATGGA	AATTTTACCT	TGTCAATTTT
B. anomala	CTGGCTTCAA	AGGGGACGCT	TCTTTTGGATG	AATAAATGGA	AATTTTACCT	TATCAATTTT
F. imbrica	CTGGCTTCAA	AGGGGACGCT	TTTTTTGATG	AATAAATGGA	AATTTTACCT	TGTCAATTTT
N. linaria	CTGGCTTCAA	AGGGGACGCT	TCTTTTGGATG	CATAAATGGA	AATTTTACCT	TGTCAATTTT
N. ericoid	CTGGCTTCAA	AGGGGACGCT	TCTTTTGGATG	CATAAATGGA	AATTTTACCT	TGTCAATTTT
N. aristat	CTGGCTTCAA	AGGGGACGCT	TCTTTTGGATG	CATAAATGGA	AATTTTACCT	TGTCAATTTT
N. scopari	CTGGCTTCAA	AGGGGACGCT	TCTTTTGGATG	CATAAATGGA	AATTTTACCT	TGTCAATTTT
N. browall	CTGGCTTCAA	AGGGGACGCT	TCTTTTGGATG	CATAAATGGA	AATTTTACCT	TGTCAATTTT
N. veitich	CTGGCTTCAA	AGGGGACGCT	TCTTTTGGATG	CATAAATGGA	AATTTTACCT	TGTCAATTTT
N. calycin	CTGGCTTCAA	AGGGGACGCT	TCTTTTGGATG	CATAAATGGC	AATTTTACCT	TGTCAATTTT
N. micrant	CTGGCTTCAA	AGGGGACGCT	TCTTTTGGATG	CATAAATGGA	AATTTTACCT	TGTCAATTTT

	1205	1215	1225	1235	1245	1255
L. linifol	TGGCAGTGTC	ATTTTCTCT	GTGCTTTCAC	ACAGAAAGGA	TTCATATAAA	GCAATTATCT
B. anomala	TGGCAGTGTC	ATTTTCTCT	GTGCTTTCAC	ACAGAAAGGA	TCCACCTAAA	TCCAAATATCT
F. imbrica	TGGCAATGTC	ATTTTCTCT	GTGCTTTCAC	ACAGAAAGGA	TCCATATAAA	ACAATTATCT
N. linaria	TGGCAGTCTT	ATTTGTCTCT	CTTCTTTCCC	CCAGAAAGGA	TCCATATAAA	CCAATTATCT
N. ericoid	TGGCAGTCTT	ATTTGTCTCT	CTTCTTTCCC	CCAGAAAGGA	TCCATATAAA	CCAATTATCT
N. aristat	TGGCAGTCTT	ATTTCTCTCT	CTTCTTTCCC	CCAGAAAGGA	TCCATATAAA	CCAATTATCT
N. scopari	TGGCAGTCTT	ATTTGTCTCT	CTTCTTTCCC	CCAGAAAGGA	TCCATATAAA	CCAATTATCT
N. browall	TGGCAGTCTT	ATTTGTCTCT	CTTCTTTCCC	CCAGAAAGGA	TCCATATAAA	CCAATTATCT
N. veitich	TGGCAGTCTT	ATTTCTCTCT	CTTCTTTCCC	CCAGAAAGGA	TCCATATAAA	CCAATTATCT
N. calycin	TGGCAGTCTT	ATTTGTCTCT	CTTCTTTCCC	CCAGAAAGGA	TCCATATAAA	CCAATTATCT
N. micrant	TGGCAGTCTT	ATTTGTCTCT	CTTCTTTCCC	CCAGAAAGGA	TCCATATAAA	CCAATTATCT

	1265	1275	1285	1295	1305	1315
L. linifol	ACCCATTCCC	GTGACTTTAT	GGGCTATCTT	TCAAGTGTGC	GACTAAATCC	TTCAATGGTA
B. anomala	ACCCATTCCC	GTGACTTTAT	GGGCTATCTT	TCAAGTGTGC	GACTAAATCC	TTCAATGGTA
F. imbrica	AATCATTCCC	GTGACTTTAT	GGGCTATCTT	TCAAGTGTGC	RACTAAATCC	TTCAATGGTM
N. linaria	ACCCATTTCC	GTGACTTTAT	GGGCTATCTT	TCAAGTGTGC	GACTAAATCC	TTCAATGGTA
N. ericoid	ACCCATTTCC	GTGACTTTAT	GGGCTATCTT	TCAAGTGTGC	GACTAAATCC	TTCAATGGTA
N. aristat	ACCCATTTCC	GTGACTTTAT	GGGCTATCTT	TCAAGTGTGC	GACTAAATCC	TTCAATGGTA
N. scopari	ACCCATTTCC	GTGACTTTAT	GGGCTATCTT	TCAAGTGTGC	GACTAAATCC	TTCAATGGTA
N. browall	ACCCATTTCC	GTGACTTTAT	GGGCTATCTT	TCAAGTGTGC	GACTAAATCC	TTCAATGGTA
N. veitich	ACCCATTTCC	GTGACTTTAT	GGGCTATCTT	TCAAGTGTGC	GACTAAATCC	TTCAATGGTA
N. calycin	ACCCATTTCC	GTGACTTTAT	GGGCTATCTT	TCAAGTGTGC	GACTAAATCC	TTCAATGGTA
N. micrant	ACCCATTTCC	GTGACTTTAT	GGGCTATCTT	TCAAGTGTGC	GACTAAATCC	TTCAATGGTA

	1325	1335	1345	1355	1365	1375
L. linifol	CGTAGTCAAA	TGTTARAAAA	TTCTTTTCTA	ATCAATAATG	CAATTAAGAA	-GTTCGA-TA
B. anomala	CGTAGTCAAA	TCTGCGAAAA	TTCATTTGTA	ATCAATAATG	CAATTAAGAA	-GTTCGA-TA
F. imbrica	CGTAGTCAAA	TGTTAGAAAA	TTCATTTCTA	ATCAATAATG	CAATTAAGAA	-GTTCGA-TA
N. linaria	CGTAGTCAAA	TCTGCGAAAA	TTCATTTGGA	ATCAATAATG	CAATTAAGAA	-GTTCGA-TA
N. ericoid	CGTAGTCAAA	TCTGCGAAAA	TTCATTTGGA	ATCAATAATG	CAATTAAGAA	-GTTCGA-TA
N. aristat	CGTAGTCAAA	TCTGCGAAAA	TTCATTTGGA	ATCAATAATG	CAATTAAGAA	-GTTCGA-TA
N. scopari	CGTAGTCAAA	TCTGCGAAAA	TTCATTTGGA	ATCAATAATG	CAATTAAGAA	-GTTCGA-TA
N. browall	CGTAGTCAAA	TCTGCGAAAA	TTCATTTGGA	ATCAATAATG	CAATTAAGAA	-GTTCGA-TA
N. veitich	CGTAGTCAAA	TCTGCGAAAA	TTCATTTGGA	ATCAATAATG	CAATTAAGAA	-GTTCGA-TA
N. calycin	CGTAGTCAAA	TCTGCGAAAA	TTCATTTGGA	ATCAATAATG	CAATTAAGAA	-GTTCGA-TA
N. micrant	CGTAGTCAAA	TCTGCGAAAA	TTCATTTGGA	ATCAATAATG	CAATTAAGAA	-GTTCGA-TA

	1385	1395	1405	1415	1425	1435
L. linifol	CCCTTGTTCC	AATTATTCCT	TTGATTGG-A	TCATTAGCTA	AAGCAAACCT	TTGTACCATA
B. anomala	CCCTTGTTCC	AATTATTCCT	TTGATTGG-A	TCATTAGCTA	AAACAAACCT	TTGTACCGTA
F. imbrica	CCCTTGTTCC	AATTATTCCT	TTGATTGG-A	TCATTAGCTA	AAGCAAACCT	TTGTACCGTA
N. linaria	CCCTTGTTCC	AGTTATTCCT	TTGATTGG-A	TCATTAGCGA	AAAGAAACCT	TTGTACCGGA
N. ericoid	CCCTTGTTCC	AGTTATTCCT	TTGATTGG-A	TCATTAGCGA	AAAGAAACCT	TTGTACCGAA
N. aristat	CCCTTGTTCC	AGTTAGTCCT	TTGATTGG-A	TCATTAGCGA	AAAGAAACCT	TTGTACCGGA
N. scopari	CCCTTGTTCC	AGTTATTCCT	TTGATTGG-A	TCATTAGCGA	AAAGAAACCT	TTGTACCGGA
N. browall	CCCTTGTTCC	AGTTATTCCT	TTGATTGG-A	TCATTAGCGA	AAAGAAACCT	TTGTACCGGA
N. veitich	CCCTTGTTCC	AGTTAGTCCT	TTGATTGG-A	TCATTAGCGA	AAAGAAACCT	TTGTACCGGA
N. calycin	CCCTTGTTCC	AGTTATTCCT	TTGATTGGGA	TCATTAGCGA	AAAGAAACCT	TTGTANCGGA
N. micrant	CCCTTGTTCC	AGTTATTCCT	TTGATTGG-A	TCATTAGCGA	AAAGAAACCT	TTGTACCGGA

 1445 1455 1465 1475 1485 1495
L. linifol	TTAGGGCATC	CCATTAGTAA	ACCGCTTTGG	TCCGATTT-A	TCAG-ATTCT	GATATTATTG
B. anomala	TTAGGGCATC	CCATTAGTAA	ACCGCTTTGG	TCCGATTT-A	TCCG-ATTCT	GAGATTATTG
F. imbrica	TTAGGGCATC	CCATTAGTAA	ACCGGTTTGG	TCCGATTT-A	TCAG-ATTCT	GATATTATTG
N. linaria	TTAGGGCATC	CCATTAGTAA	ACCGCTTTGG	TCCGATTT-C	TCAG-ATTCT	GATATTATTG
N. ericoid	TTAGGGCATC	CCATTAGTAA	ACCGCTTTGG	TCCGATTT-A	TCAG-ATTCT	GATATTATTG
N. aristat	TTAGGGCATC	CCATTAGTAA	ACCGCTTTGG	TCCGATTT-A	TCGG-ATTCT	GATATTATTG
N. scopari	TTAGGGCATC	CCATTAGTAA	ACCGCTTTGG	TCCGATTT-A	TCAG-ATTCT	GATATTATTG
N. browall	TTAGGGCATC	CCATTAGTAA	ACCGCTTTGG	TCCGATTT-A	TCAG-ATTCT	GATATTATTG
N. veitich	TTAGGGCATC	CCATTAGTAA	ACCGCTTTGG	TCCGATTT-A	TCGG-ATTCT	GATATTATTG
N. calycin	TTAGGGCATC	CCATTAgTAA	aCGCTTTTGG	TCCGATTTTA	TCAACATTCT	GATAtTATTG
N. micrant	TTAGGGCATC	CCATTAGTAA	ACCGCTTTGG	TCCGATTT-C	TCAG-ATTCT	GATATTATTG

 1505 1515 1525 1535 1545 1555
L. linifol	ACCGATTTGG	G-CGTATATG	CAGAAATCTT	TTTCATTATT	-ATAGCGGAT	CTTCCAAAAA
B. anomala	ACCGATTTGG	G-CGTATATG	GAGAAATCTT	TTTCATTATT	-ATAGCGGAT	CTTCCAAAAA
F. imbrica	ACCGATTTGG	G-CGTATATG	CAAAAATCTT	TTTCATTATT	-ATAGCGGAT	CTTCCAAAAA
N. linaria	ACCGATTTGG	G-CGTATATG	CAGAACTCTT	TTTCATTATT	-ATAGCGGAT	CTTCCAAAAA
N. ericoid	ACCGATTTGG	G-CGTATATG	CAGAACTCTT	TTTCATTATT	-ATAGCGGAT	CTTCCAAAAA
N. aristat	ACCGATTTGG	G-CGTATATG	CAGAACTCTT	TTTCATTATT	-ATAGCGGAT	CTTCCAAAAA
N. scopari	ACCGATTTGG	G-CGTATATG	CAGAACTCTT	TTTCATTATT	-ATAGCGGAT	CTTCCAAAAA
N. browall	ACCGATTTGG	G-CGTATATG	CAGAACTCTT	TTTCATTATT	-ATAGCGGAT	CTTCCAAAAA
N. veitich	ACCGATTTGG	G-CGTATATG	CAGAACTCTT	TTTCATTATT	-ATAGCGGAT	CTTCCAAAAA
N. calycin	ACCGATTTGG	GGCGNATATG	CAAAACTCTT	TTTCAATATT	TATAGCCGAA	CTTCCAAAAA
N. micrant	ACCGATTTGG	G-CGTATATG	CAGAACTCTT	TTTCATTATT	-ATAGCGGAT	CTTCCAAAAA

 1565 1575 1585 1595 1605 1615
L. linifol	AAAGACTTTA	TATCGAATAA	AGTATATACT	TCGACTTTCT	TGTGCTAGAA	C-TTTAGCTC
B. anomala	AAAGACTTTA	TATCGAATAA	AGTATATACT	TCGACTTTCT	TGTGCTAGAA	C-TTTAGCTC
F. imbrica	AAAGACTTTA	TATCGAATAA	AGTATATACT	TCGACTTTCT	TGTGCTAGAA	C-TTTAGCTC
N. linaria	AA-GACTTTA	TATCGAATAA	AGTATATACT	TCGACTTTCT	TGTGCTAGAA	C-TTTAGCTC
N. ericoid	AA-GMcTTTA	TATCGAATAA	AGTATATACT	TCGACTTTCT	TGTGCTAgAA	C-TTTAGCTC
N. aristat	AA-GACTTTA	TATCGAATAA	-GTATATACT	TCGACTTTCT	TGTGCTAGAA	C-TTTAGCTC
N. scopari	AA-GMcTTTA	TATCGAATAA	AGTATATACT	TCGACTTTCT	TGTGCTAGAA	CGTTTTAGCTC
N. browall	AA-GACTTTA	TATCGAATAA	AGTATATACT	TCGACTTTCT	TGTGCTAGAA	C-TTTAGCTC
N. veitich	AA-GMcTTTA	TATCGAATAA	AGTATATACT	TCGACTTTCT	TGTGCTAGAA	C-TTTAGCTC
N. calycin	AA-ANATTTA	TATCGAATAA	AGTATATACT	TCGACTTTCT	TGTGCTAGAA	C-TTTAGCTC
N. micrant	AAAGACTTTA	TATCGAATAA	AGTATATACT	TCGACTTTCT	TGTGCTAGAA	C-TTTAGCTC

 1625 1635 1645 1655 1665 1675
L. linifol	GGAAACACAA	AAC TACTGTA	CGGA-CTTTT	TTGAAAAGAT	CCGGCTCAGA	ATTATTG-GA
B. anomala	GGAAACACAA	AAC TACTGTA	CGGA-CTTTT	TTGAAAAGAT	CTGGCTCGGA	ATTATTG-GA
F. imbrica	GGAAACACAA	AAC TACTGTA	CGGA-CTTTT	TTGAAAAGAT	CCGGCTCGGA	ATTATTG-GA
N. linaria	GGAAACACAA	AAC TACGGTA	CGGA-CTTTT	TTGAAAAGAT	CCGGCTCGGA	ATTATTA-GA
N. ericoid	GGAAACACAA	AAC TACGGTA	CKGA-CTTTT	TTGAAAAGAT	CCGGCTCGGA	ATTATTA-GA
N. aristat	GGAAACACAA	AAC TACGGTA	CGGA-CTTTT	TTGAAAAGAT	CCGGCTCGGA	ATTATTC-GA
N. scopari	GGAAACACaa	aaCTACGGTa	CGGaACTTTT	TTGAAAAKAT	CCgGCTCGGA	ATTATTA-GA
N. browall	GGAAACACAA	AAC TACGGTA	CGGA-CTTTT	TTGAAAAGAT	CCGGCTCGGA	ATTATTACGA
N. veitich	GGAAACACAA	AAC TACGGTA	CGGA-CTTTT	TTGAAAAGAT	CCGGCTCGGA	ATTATTG-GA
N. calycin	GGAAACACAA	AAC TACGGTA	CGGA-CTTTT	TTGAAAAGAT	CCGGCTCGGA	ATTATTA-GA
N. micrant	GGAAACACAA	AAC TACGGTA	CGGA-CTTTT	TTGAAAAGAT	CCGGCTCGGA	ATTATTA-GA

 1685 1695 1705 1715 1725 1735
L. linifol	AGAATTCTTA	ACGTCGGAAG	AACAAATTCT	TTCTTTGACC	CTCCACGAG	CTTCTTCTAG
B. anomala	AGAATTCTTA	ACGTCGGAAG	AACAAGTTCT	TTCTTTGACC	TTCCACGAG	CTTCTTCTAG
F. imbrica	AGAATTCTTA	ACGTCGGAAG	AACAAGTTCT	TTCTTTGACC	TTCCACGAG	CTTCTTCTAG
N. linaria	AGAATTCTTA	ACGTCGGAAG	AACAAGTTCT	TTCTTTGACC	TTCCACGAG	CTTCTTCTAA
N. ericoid	AGAATTCTTA	ACGTCGGAAG	AACAAGTTCT	TTCTTTGACC	TTCCACGAG	CTTCTTCTAA
N. aristat	AGAATTCTTA	ACGTCGGAAG	AAGAAGTTCT	TTCTTTGACC	TTCCACGAG	CTTCTTCTAA
N. scopari	AgAATTCTTa	ACGTCgGaAg	AACAAGTTCT	TTCTTTGACC	TTCCACGAG	CTTCTTCTAA
N. browall	AGAATTCTTA	ACGTCGGAAG	AACAAGTTCT	TTCTTTGACC	TTCCACGAG	CTTCTTCTAA
N. veitich	AGAATTCTTA	ACGTCGGAAG	AAGAAGTTCT	TTCTTTGACC	TTCCACGAG	CTTCTTCTAA

N. calycin	AGAATTCTTA	ACGTCGGAAG	AACAAGTCTT	TTCTTTGACC	TTCCCACGAG	CTTCTTCGAA
N. micrant	AGAATTCTTA	ACGTCGGAAG	AACAAGTCTT	TTCTTTGACC	TTCCCACGAG	CTTCTTCTAA

	1745	1755	1765	1775	1785	1795
L. linifol	TTTGTGGGGA	GTATATAGAA	GTCGGATTTG	GTATTTGGAT	ATTTTTTGTA	TCAATGATCT
B. anomala	TTTGTGGGGA	GTATATAGAA	GTCGGGTTTG	GTATTTGGAT	ATTTTTTCTA	TCAATNATCT
F. imbrica	TTTGTGGGGA	GTATATAGAA	GTCGGATTTG	GTATTTGGAT	ATTTTTTGTA	TCAATGATCT
N. linaria	TTTGTGGGGC	GTATATAGAA	GTCGGATTTG	GTATTTGGAT	ATTTTTTCTA	TCAATGATCT
N. ericoid	TTTGTGGGGC	GTATATAGAA	GTCGGATTTG	GTATTTGGAT	ATTTTTTCTA	TCAATGATCT
N. aristat	TTTATGGGGC	GTATATAGAA	GTCGTATTTG	GTATTTGGAT	ATTTTTTCTA	TCAATGATCT
N. scopari	TTNGTGGGGC	GTATATAGAA	GTCGGATTTG	GTATTTGGAT	ATTTTTTCTA	TCAATGATCT
N. browall	TTTGTGGGGC	GTATATAGAA	GTCGGATTTG	GTATTTGGAT	ATTTTTTCTA	TCAATGATCT
N. veitich	TTTATGGGGC	GTATATAGAA	GTCGTATTTG	GTATTTGGAT	ATTTTTTCTA	TCAATGATCT
N. calycin	TTTGTGGGGC	GTATATAGAA	GTCGGATTTG	GTATTTGGAT	ATTTTTTCTA	TCAATGATCT
N. micrant	TTTGTGGGGC	GTATATAGAA	GTCGGATTTG	GTATTTGGAT	ATTTTTTCTA	TCAATGATCT

	1805	1815	1825	1835	1845	1855
L. linifol	GGCGAATTAT	CAATGATTCA	TTCTAAGATT	T-----	-----T	CTAAATGATG
B. anomala	GGCGAATTAT	CAATGATTCA	TTCTAAGATT	TTCTAAATGG	AATTTT---T	CTAAATGATA
F. imbrica	GGCGAATTAT	CAATGATTCA	TTCTAAGATT	T-----	-----T	CTAAATGATG
N. linaria	GGCGAATTAT	CAATGATTCA	TTCTAAGATT	TTCGAAATGG	AAATTTTCTT	CGAAATGATG
N. ericoid	GGCGAATTAT	CAATGATTCA	TTCTAAGATT	TTCGAAATGG	AAATTTTCTT	CGAAATGATG
N. aristat	GGCGAATTCT	CAATGATTCA	TTCTAAGATT	TTCGAAATGG	AAATTTTGTT	CTAAATGATG
N. scopari	GGcGAATTAT	caAtGATTCA	TTCTAAgATT	TTCGAAATGG	AAATTTTCTT	CGAARTGATG
N. browall	GGCGAATTAT	CAATGATTCA	TTCTAAGATT	TTCGAAATGG	AAATTTTCTT	CGAAATGATG
N. veitich	GGCGAATTCT	CAATGATTCA	TTCTAAGATT	TTCGAAATGG	AAATTTTGTT	CTAAATGATG
N. calycin	GGCGAATTCT	CAATGATTCA	TTCTAAGATT	TTCGAAATGG	AAATTTTGTT	CTAAATGATG
N. micrant	GGCGAATTAT	CAATGATTCA	TTCTAAGATT	TTCGAAATGG	AAATTTTCTT	CGAAATGATG

	1865	1875	1885	1895	1905	1915
L. linifol	AGGAGATACA	AAATTTAAAC	TATTCGAAA	TGTTGATTGT	AATAGTAATA	AGGGGTAAAT
B. anomala	AGGAGATAAA	AAATTTTCAC	TATTCGAAA	TGTTGATTGT	AATAGTCATA	AGGGGTAAAT
F. imbrica	AGGAGATCAA	AAATTTAAAC	TATTCGAAA	TGTTGATTGT	AATAGTAATA	AGGGGTAAAT
N. linaria	AGGAGATCAA	AAATTTTCAC	TATTCGAAA	TGTGGATTGG	AATAGTAATA	AGGGGTAAAT
N. ericoid	AGGAGATCAA	AAATTTTCAC	TATTCGAAA	TGTGGATTGG	AATAGTAATA	AGGGGTAAAT
N. aristat	AGGAGATACA	AAATTCCTCC	TATTCGAAA	TGTGGATTGT	AATAGTAATA	AGGGGTAAAT
N. scopari	AGRARATCMA	AAATTTTCAC	TATTCtGaAA	TGTGGATGNN	AaTAGTAaTA	agGGGTaAAT
N. browall	AGGAGATCAA	AAATTTTCAC	TATTCGAAA	TGTGGATTGG	AATAGTAATA	AGGGGTAAAT
N. veitich	AGGAGATACA	AAATTCCTCC	TATTCGAAA	TGTGGATTGT	AATAGTAATA	AGGGGTAAAT
N. calycin	AGGAGATAAA	AAATTGTCAC	TATTCGAAA	TGTCGATTGT	AATAGTAATA	AGGGGTAAAT
N. micrant	AGGAGATCAA	AAATTTTCAC	TATTCGAAA	TGTGGATTGG	AATAGTAATA	AGGGGTAAAT

	1925	1935	1945	1955	1965	1975
L. linifol	CAACTG-AGT	ATTCAACTTT	TTAAATTAATA	GTCTTTCTAA	TTTCTAAAAG	AAAGGAACTG
B. anomala	CAACTG-AGT	ATTCAACTTT	TTAAACGAAA	GTCTTTCTAA	TTTCTATAAG	AAAGGAACTG
F. imbrica	CAACTG-AGT	ATTCAACTTT	TTAAA-TAAA	GTCTTTCTAA	TTTATATAAG	AAAGGAACTG
N. linaria	CAACTG-AGT	ATTCCACTTT	TTAAATTAATA	GTCTTTCTAA	TTTCTATAAG	AAAGGAACTG
N. ericoid	CAACTG-AGT	ATTCCACTTT	TTAAATTAATA	GTCTTTCTAA	TTTCTATAAG	AAAGGAACTG
N. aristat	CAACTG-AGT	ATTCCACTTT	TTAAATTCAA	GTCTTTCTAA	TTTCGATAAG	AAAGGAACTG
N. scopari	cAACTGTAgT	AtTCCACTTT	TTAAATTAATA	gTcTTTCTAA	TTTCTATTAG	AaagGaaCTG
N. browall	CAACTG-AGT	ATTCCACTTT	TTAAATTAaA	GTCTTTCTAA	TTTCTATAAG	A-AGGAACTG
N. veitich	CAACTG-AGT	ATTCCACTTT	TTAAATTCaA	GTCTTTCTAA	TTTCGATAAG	AAAGGAACTG
N. calycin	CAACTG-AGT	ATTCCACTTT	TTAAATTAATA	GTCTTTCTAA	TTTCTATAAG	AAAGGAACTG
N. micrant	CAACTG-AGT	ATTCCACTTT	TTAAATTAATA	GTCTTTCTAA	TTTCTATAAG	AAAGGAACTG

	1985	1995	2005	2015	2025	2035
L. linifol	ATGTATACAT	AGGGAAAGCC	GTGTGCAATG	AAAAATGCAA	-----	-----
B. anomala	ATGTATACAT	AGGGAAAGCC	GTGTGCAATG	AAAAATGCAA	-----	-----
F. imbrica	ATGTATACAT	AGGGAAAGCC	GTGTGCAATG	AAAAATGCAA	-----	-----
N. linaria	ATGTATACAT	AGGGAAAGCC	GTGTGCAATG	AAAAATGCAA	-----	-----
N. ericoid	ATGTATACAT	AGGGAAAGCC	GTGTGCAATG	AAAAATGCAA	-----	-----
N. aristat	ATGTATACAT	AGGGAAAGCC	GTGTGCAATG	AAAAATGCAA	-----	-----
N. scopari	ATGTAtACAT	AGGGAAAGCC	gtgtgcaaTG	aaaaaTGcaa	-----	-----

```
N. browall  ATGTATACAC AGGGAAAGcC GTGTGCAATG AAAAANGCAA -----  
N. veitich  ATGTATACAT AGGGAAAGCC GTGTGCAATG AAAAATGCAA -----  
N. calycin  ATGTATACAT AGGGAAAGCC GTGTGCAATG AAAAATGCAA -----  
N. micrant  ATGTATACAT AGGGAAAGCC GTGTGCAATG AAAAATGCAA -----
```

Anexo II-c: Matriz de datos de la región *trnL*

	5	15	25	35	45	55
N.linariae	ACTTAATTGG	ATTGAGCCTT	GGTATGGAAA	CTTACTAAGT	GATCACTTTC	AAATT-CAGA
N.ericoides	ACTTAATTGG	ATTGAGCCTT	GGTATGGAAA	CTTACTAAGT	GATCACTTTC	AAATT-CAGA
N.aristata	ACTTAATTGG	ATTGAGCCTT	GGTATGGAAA	CTTACTAAGT	GATCACTTTC	AAATT-CAGA
N.scoparia	GCTTTCCTTG	GTTGAGCCTT	GGTATGGAAA	CTTGCTAAGT	GATCACTTTC	AAATT-CAGA
N.browallo	ACTTAATTGG	ATTGAGCCTT	GGTATGGAAA	CTTACTAAGT	GATCACTTTC	AAA-T-CAGA
N.veitichi	ACTTAATTGG	ATTGAGCCTT	GGTATGGAAA	CTTACTAAGT	GATCACTTTC	AAA-TtCAGA
N.calycina	ACTTAATTGG	ATTGAGCCTT	GGTATGGAAA	CTTACTAAGT	GATTACTTTC	AAATT-CAGA
N.micranth	ACTTAATTGG	ATTGAGCCTT	GGTATGGAAA	CTTACTAAGT	GATCACTTTC	AAATT-CAGA
	65	75	85	95	105	115
N.linariae	GAAACCTGCG	AATTAACAAA	AATGGGCAAT	CCTGAGCCAA	ATCCTGTTTT	CCGAAAACAA
N.ericoides	GAAACCTGCG	AATTAACAAA	AATGGGCAAT	CCTGAGCCAA	ATCCTGTTTT	CCGAAAACAA
N.aristata	GAAACCTGCG	AATTAACAAA	AATGGGCAAT	CCTGAGCCAA	ATCCTGTTTT	CCGAAAACAA
N.scoparia	GAAACCTGCG	AATTAACAAA	AATGGGCAAT	CCTGAGCCAA	ATCCTGTTTT	CCGAAAACAA
N.browallo	GAAACCTGCG	AATTAACAAA	AATGGGCAAT	CCTGAGCCAA	ATCCTGTTTT	CCGAAAACAA
N.veitichi	GAAACCTGCG	AATTAACAAA	AATGGGCAAT	CCTGAGCCAA	ATCCTGTTTT	CCGAAAACAA
N.calycina	GAAACCTGCG	AATTAACAAA	AATGGGCAAT	CCTGAGCCAA	ATCCTGTTTT	CCGAAAACAA
N.micranth	GAAACCTGCG	AATTAACAAA	AATGGGCAAT	CCTGAGCCAA	ATCCTGTTTT	CCGAAAACAA
	125	135	145	155	165	175
N.linariae	ACAAAGGTTT	AG-AAAAAA	AGGATAGGTG	CAGAGACTCA	ATGGAAGCTA	TTCTAACAAA
N.ericoides	ACAAAGGTTT	AG-AAAAAA	AGGATAGGTG	CAGAGACTCA	ATGGAAGCTA	TTCTAACAAA
N.aristata	ACAAAGGTTT	AG-AAAAAA	GGGATAGGTG	CAGAGACTCA	ATGGAAGCTA	TTCTAACAAA
N.scoparia	ACAAAGGTTT	AG-AAAAAA	AGGATAGGTG	CAGAGACTCA	ATGGAAGCTA	TTCTAACAAA
N.browallo	ACAAAGGTTT	AG-AAAAAA	AGGATAGGTG	CAGAGACTCA	ATGGAAGCTA	TTCTAACAAA
N.veitichi	ACAAAGGTTT	AG-AAAAAA	GGGATAGGTG	CAGAGACTCA	ATGGAAGCTA	TTCTAACAAA
N.calycina	ACAAAGGTTT	AG-AAAAAA	AGGATAGGTG	CAGAGACTCA	ATGGAAGCTA	TTCTAACAAA
N.micranth	ACAAAGGTTT	AG-AAAAAA	AGGATAGGTG	CAGAGACTCA	ATGGAAGCTA	TTCTAACAAA
	185	195	205	215	225	235
N.linariae	TGGAGTTAAA	TGCGTTGGTA	GAGGAATCCT	TCCATCGAAA	TTTC-----	AGAAAGAAAG
N.ericoides	TGGAGTTAAA	TGCGTTGGTA	GAGGAATCCT	TCCATCGAAA	TTTC-----	AGAAAGAAAG
N.aristata	TGGAGTTAAA	TGCGTTGGTA	GAGGAATCCT	TCCATCGAAA	TTTC-----	AGAAAGAAAG
N.scoparia	TGGAGTTAAA	TGCGTTGGTA	GAGGAATCCT	TCCATCGAAA	TTTC-----	AGAAAGAAAG
N.browallo	TGGAGTTAAA	TGCGTTGGTA	GAGGAATCCT	TCCATCGAAA	TTTC-----	AGAAAGAAAG
N.veitichi	TGGAGTTAAA	TGCGTTGGTA	GAGGAATCCT	TCCATCGAAA	TTTC-----	AGAAAGAAAG
N.calycina	TGGAGTTAAA	TGCGTTGGTA	GAGGAATCCT	TCCATCGAAA	TTTC-----	AGAAAGAAAG
N.micranth	TGGAGTTAAA	TGCGTTGGTA	GAGGAATCCT	TCCATCGAAA	TTTC-----	AGAAAGAAAG
	245	255	265	275	285	295
N.linariae	AGA--ATGAA	TAAACGTATA	TACATACGTA	TTGAATACTA	TATCAAATGA	TTAATGACGA
N.ericoides	AGA--ATGAA	TAAACGTATA	TACATACGTA	TTGAATACTA	TATCAAATGA	TTAATGACGA
N.aristata	CGA--ATGAA	TAAACGTATA	TACATATGTT	TTGAATACTA	TATCAAATGA	TTAATGACGA
N.scoparia	AGA--ATGAA	TAAACGTATA	TACATACGTA	TTGAATACTA	TATCAAATGA	TTAATGACGA
N.browallo	AGA--ATGAA	TAAACGTATA	TACATACGTA	TTGAATACTA	TATCAAATGA	TTAATGACGA
N.veitichi	CGA--ATGAA	TAAACGTATA	TACATATGTT	TTGAATACTA	TATCAAATGA	TTAATGACGA
N.calycina	AGA--ATGAA	TAAACGTATA	TACATACGTA	TTGAATACTA	TATCAAATGA	TTAATGACGA
N.micranth	AGA--ATGAA	TAAACGTATA	TACATACGTA	TTGAATACTA	TATCAAATGA	TTAATGACGA
	305	315	325	335	345	355
N.linariae	CCCGAATTCG	TATTTTTTCT	ATAAAAAATC	AAAGAATTGG	TGTGAATCGA	TTCCGCATTG
N.ericoides	CCCGAATTCG	TATTTTTTCT	ATAAAAAATC	AAAGAATTGG	TGTGAATCGA	TTCCGCATTG
N.aristata	CCCGAATTCG	TATTTTTTCT	ATCAAAAAATC	AAAGAATTGG	TGTGAATCGA	TTCCGCATTG
N.scoparia	CCCGAATTCG	TATTTTTTCT	ATAAAAAATC	AAAGAATTGG	TGTGAATCGA	TTCCGCATTG
N.browallo	CCCGAATTCG	TATTTTTTCT	ATAAAAAATC	AAAGAATTGG	TGTGAATCGA	TTCCGCATTG
N.veitichi	CCCGAATTCG	TATTTTTTCT	ATCAAAAAATC	AAAGAATTGG	TGTGAATCGA	TTCCGCATTG
N.calycina	CCCGAATTCG	TATTTTTTCT	ATAAAAAATC	AAAGAATTGG	TGTGAATCGA	TTCCGCATTG
N.micranth	CCCGAATTCG	TATTTTTTCT	ATAAAAAATC	AAAGAATTGG	TGTGAATCGA	TTCCGCATTG
	365	375	385	395	405	415
N.linariae	AAGAAAGAAT	CGAATATTCA	TTGATCAAAT	CATTCACTCC	CGAGTCTGAT	AGATCTTTTG
N.ericoides	AAGAAAGAAT	CGAATATTCA	TTGATCAAAT	CATTCACTCC	CGAGTCTGAT	AGATCTTTTG
N.aristata	AAGAAAGAAT	CGAATATTCA	TTGATCAAAT	CATTCACTCC	CGAGTCTGAT	AGATCTTTTG

N.scoparia	AAGAAAGAAT	CGAATATTCA	TTGATCAAAT	CATTCACTCC	CGAGTCTGAT	AGATCTTTTG
N.browallo	AAGAAAGAAT	CGAATATTCA	TTGATCAAAT	CATTCACTCC	CGAGTCTGAT	AGATCTTTTG
N.veitichi	AAGAAAGAAT	CGAATATTCA	TTGATCAAAT	CATTCACTCC	CGAGTCTGAT	AGATCTTTTG
N.calycina	AAGAAAGAAT	CGAATATTCA	TTGATCAAAT	CATTCACTCC	CGAGTCTGAT	AGATCTTTTG
N.micranth	AAGAAAGAAT	CGAATATTCA	TTGATCAAAT	CATTCACTCC	CGAGTCTGAT	AGATCTTTTG

	425	435	445	455	465	475
N.linariae	AAGAACTGAT	TAATCGGACG	AGAATAAAGA	TAGAGTCCCG	TTCTACATGT	CAATACCGGC
N.ericoidae	AAGAACTGAT	TAATCGGACG	AGAATAAAGA	TAGAGTCCCG	TTCTACATGT	CAATACCGGC
N.aristata	AAGAACTGAT	TAATCGGACG	AGAATAAAGA	TAGAGTCCCG	TTCTACATGT	CAATACCGGC
N.scoparia	AAGAACTGAT	TAATCGGACG	AGAATAAAGA	TAGAGTCCCG	TTCTACATGT	CAATACCGGC
N.browallo	AAGAACTGAT	TAATCGGACG	AGAATAAAGA	TAGAGTCCCG	TTCTACATGT	CAATACCGGC
N.veitichi	AAGAACTGAT	TAATCGGACG	AGAATAAAGA	TAGAGTCCCG	TTCTACATGT	CAATACCGGC
N.calycina	AAGAACTGAT	TAATCGGACG	AGAATAAAGA	TAGAGTCCCG	TTCTACATGT	CAATACCGGC
N.micranth	AAGAACTGAT	TAATCGGACG	AGAATAAAGA	TAGAGTCCCG	TTCTACATGT	CAATACCGGC

	485	495	505	515	525	535
N.linariae	AACAATGCAA	TTTATAGTAA	GAGGAAAATC	CGTCGACTTT	CAAAAATCGTG	AGGGTTCAAG
N.ericoidae	AACAATGCAA	TTTATAGTAA	GAGGAAAATC	CGTCGACTTT	CAAAAATCGTG	AGGGTTCAAG
N.aristata	AACAATGCAA	TTTATAGTAA	GAGGAAAATC	CGTCGACTTT	CAAAAATCGTG	AGGGTTCAAG
N.scoparia	AACAATGCAA	TTTATAGTAA	GAGGAAAATC	CGTCGACTTT	CAAAAATCGTG	AGGGTTCAAG
N.browallo	AACAATGCAA	TTTATAGTAA	GAGGAAAATC	CGTCGACTTT	CAAAAATCGTG	AGGGTTCAAG
N.veitichi	AACAATGCAA	TTTATAGTAA	GAGGAAAATC	CGTCGACTTT	CAAAAATCGTG	AGGGTTCAAG
N.calycina	AACAATGCAA	TTTATAGTAA	GAGGAAAATC	CGTCGACTTT	CAAAAATCGTG	AGGGTTCAAG
N.micranth	AACAATGCAA	TTTATAGTAA	GAGGAAAATC	CGTCGACTTT	CAAAAATCGTG	AGGGTTCAAG

	545	555	565	575	585	595
N.linariae	TCCCTCTATC	CCCAAAAAGA	CTATTTCACT	GCCCAACTCT	TTATCGGACC	CCCTCTCCTT
N.ericoidae	TCCCTCTATC	CCCAAAAAGA	CTATTTCACT	GCCCAACTCT	TTATCGGACC	CCCTCTCCTT
N.aristata	TCCCTCTATC	CCCAAAAAGA	CTATTTCACT	GCCCAACTCT	TTATCGGACC	CCCTCTCCTT
N.scoparia	-----	-----	-----	-----	-----	-----
N.browallo	TCCCTCTATC	CCCAAAAAGA	CTATTTCACT	GCCCAACTCT	TTATCGGACC	CCCTCTCCTT
N.veitichi	TCCCTCTATC	CCCAAAAAGA	CTATTTCACT	GCCCAACTCT	TTATCGGACC	CCCTCTCCTT
N.calycina	TCCCTCTATC	CCCAAAAAGA	CTATTTCACT	GCCCAACTCT	TTATCGGACC	CCCTCTCCTT
N.micranth	TCCCTCTATC	CCCAAAAAGA	CTATTTCACT	GCCCAACTCT	TTATCGGACC	CCCTCTCCTT

	605	615	625	635	645	655
N.linariae	AGCGGTTC	AATTCCTTAT	CTTTTCGCATG	CACTCTATTC	TTTTCGAAAT	GGTTTGGGGC
N.ericoidae	AGCGGTTC	AATTCCTTAT	CTTTTCGCATG	CACTCTATTC	TTTTCGAAAT	GGTTTGGGGC
N.aristata	AGCGGTTC	AATTCCTTAT	CTTTTCGCATG	CACTCTATTC	TTTTCGAAAT	GGTTTGGGGC
N.scoparia	-----	-----	-----	-----	-----	-----
N.browallo	AGCGGTTC	AATTCCTTAT	CTTTTCGCATG	CACTCTATTC	TTTTCGAAAT	GGTTTGGGGC
N.veitichi	AGCGGTTC	AATTCCTTAT	CTTTTCGCATG	CACTCTATTC	TTTTCGAAAT	GGTTTGGGGC
N.calycina	AGCGGTTC	AATTCCTTAT	CTTTTCGCATG	CACTCTATTC	TTTTCGAAAT	GGTTTGGGGC
N.micranth	AGCGGTTC	AATTCCTTAT	CTTTTCGCATG	CACTCTATTC	TTTTCGAAAT	GGTTTGGGGC

	665	675	685	695	705	
N.linariae	CTAAATGGCT	TTCGCTTATC	ACAAATCTTG	TGATATATAT	GATAGACAT	
N.ericoidae	CTAAATGGCT	TTCGCTTATC	ACAAATCTTG	TGATATATAT	GATAGACAT	
N.aristata	CTAAATGGCT	TTCGCTTATC	ACAAATCTTG	TGATATATAT	GATAGACAT	
N.scoparia	-----	-----	-----	-----	-----	
N.browallo	CTAAATGGCT	TTCGCTTATC	ACAAATCTTG	TGATATATAT	GATAGACAT	
N.veitichi	CTAAATGGCT	TTCGCTTATC	ACAAATCTTG	TGATATATAT	GATAGACAT	
N.calycina	CTAAATGGCT	TTCGCTTATC	ACAAATCTTG	TGATATATAT	GATAGACAT	
N.micranth	CTAAATGGCT	TTCGCTTATC	ACAAATCTTG	TGATATATAT	GATAGACAT	

Anexo III

Relación Estigma-Polen/Estilo -Tubo polínico .

Tabla 1: Porcentaje promedio de la cantidad de tubos polínicos en tres segmentos del . estilo en cruzamientos interespecíficos donde *N. aristata* utilizada como madre.

Promedio												
observaciones 2005				observaciones 2006				observaciones 2005-2006)				
cruzamiento	1° tercio	2° tercio	3° tercio	TP* en ovario	1° tercio	2° tercio	3° tercio	TP* en ovario	1° tercio	2° tercio	3° tercio	TP* en ovario
<i>Na x Nl</i>	100	80	50	si	100	60	30	si	100	70	40	si
<i>Na x Nb</i>	100	40	*	*	100	40	*	*	100	40	*	*
<i>Na x Nv</i>	100	100	100	si	100	100	100	si	100	100	100	si
<i>Na x Nm</i>	100	*	*	*	s/g	*	*	*	100	*	*	*
<i>Na x Ne</i>	100	50	30	*	100	50	40	*	100	50	35	*
<i>Na x Nc</i>	100	60	40	si	100	40	40	si	100	50	40	si
<i>Na x Ns</i>	100	60	40	*	100	50	30	*	100	65	35	*

Na-N aristata; Nl- N. linariaefolia; Nb- N. browalloides; Nv- N. veitichii; Nm- N. micrantha; Ne- N. eriocides; Ns; N. scoparia; Nc- calycina

Tabla 2: Porcentaje promedio de la cantidad de tubos polínicos en tres segmentos del . estilo en cruzamientos interespecíficos donde *N. calycina* utilizada como madre.

Promedio												
observaciones 2005				observaciones 2006				Observaciones 2005-2006				
cruzamiento	1° tercio	2° tercio	3° tercio	TP* en ovario	1° tercio	2° tercio	3° tercio	TP* en ovario	1° tercio	2° tercio	3° tercio	TP* en ovario
<i>Nc x Nb</i>	100	40	*	*	100	40	*	*	100	40	*	*
<i>Nc x Ne</i>	100	50	25	*	100	60	40	*	100	45	35	*
<i>Nc x Na</i>	100	50	25	*	100	60	40	*	100	45	35	*
<i>Nc x Nv</i>	100	60	*	*	100	40	*	*	100	50	*	*
<i>Nc x Nm</i>	100	*	*	*	100	*	*	*	100	*	*	*
<i>Nc x Nl</i>	100	70	20	*	100	50	40	*	100	60	30	*
<i>Nc x Ns</i>	100	60	30	*	100	60	40	*	100	60	37	*

Na-N aristata; Nl- N. linariaefolia; Nb- N. browalloides; Nv- N. veitichii; Nm- N. micrantha; Ne- N. eriocides; Ns; N. scoparia; Nc- calycina

Tabla 3: Porcentaje promedio de la cantidad de tubos polínicos en tres segmentos del estilo . en cruzamientos interespecíficos donde *N. eriocides* utilizada como madre.

Promedio												
observaciones 2005				observaciones 2006				observaciones 2005-2006				
cruzamiento	1° tercio	2° tercio	3° tercio	TP* en ovario	1° tercio	2° tercio	3° tercio	TP* en ovario	1° tercio	2° tercio	3° tercio	TP* en ovario
<i>Ne x Nb</i>	50	*	*	*	*	*	*	*	25	*	*	*
<i>Ne x Nl</i>	100	100	100	si	100	100	100	si	100	100	100	si
<i>Ne x Na</i>	100	50	25	*	100	50	25	*	100	50	25	*
<i>Ne x Nv</i>	100	60	30	*	100	50	40	*	100	55	35	*
<i>Ne x Nm</i>	100	*	*	*	100	*	*	*	100	*	*	*
<i>Ne x Nc</i>	100	*	*	*	100	*	*	*	100	*	*	*
<i>Ne x Ns</i>	100	100	100	si	100	100	100	si	100	100	100	si

Na-N aristata; Nl- N. linariaefolia; Nb- N. browalloides; Nv- N. veitichii; Nm- N. micrantha; Ne- N. eriocides; Ns; N. scoparia; Nc- calycina

Tabla 4. Porcentaje promedio de la cantidad de tubos polínicos en tres segmentos del estilo en cruzamientos interespecíficos donde *N. calycina* utilizada como madre.

Promedio												
	observaciones 2005				observaciones 2006				Observaciones 2005-2006			
cruzamiento	1° tercio	2° tercio	3° tercio	TP* en ovario	1° tercio	2° tercio	3° tercio	TP* en ovario	1° tercio	2° tercio	3° tercio	TP* en ovario
<i>Nl x Nb</i>	100	*	*	*	100	*	*	*	100	*	*	*
<i>Nl x Ne</i>	100	100	80	si	100	100	70	si	100	100	75	si
<i>Nl x Na</i>	100	40	*	*	100	50	10	*	100	45	5	*
<i>Nl x Nv</i>	100	60	*	*	100	50	*	*	100	55	*	*
<i>Nl x Nm</i>	50	*	*	*	30	*	*	*	40	*	*	*
<i>Nl x Nc</i>	100	50	35	*	100	50	35	*	100	50	35	*
<i>Nl x Ns</i>	100	100	100	si	100	100	100	si	100	100	100	si

Na-N aristata; Nl- N. linariaefolia; Nb- N. browalloides; Nv- N. veitchii; Nm- N. micrantha; Ne- N. ericoides; Ns; N. scoparia; Nc- calycina

Tabla 5. Porcentaje promedio de la cantidad de tubos polínicos en tres segmentos del estilo en cruzamientos interespecíficos donde *N. micranthaa* utilizada como madre.

Promedio												
	observaciones 2005				observaciones 2006				observaciones 2005-2006			
cruzamiento	1° tercio	2° tercio	3° tercio	TP* en ovario	1° tercio	2° tercio	3° tercio	TP* en ovario	1° tercio	2° tercio	3° tercio	TP* en ovario
<i>Nm x Nb</i>	100	100	100	si	100	100	100	si	100	100	100	si
<i>Nm x Nl</i>	100	100	100	si	100	100	100	si	100	100	100	si
<i>Nm x Na</i>	100	100	100	si	100	100	100	si	100	100	100	si
<i>Nm x Nv</i>	100	100	100	si	100	100	100	si	100	100	100	si
<i>Nm x Ne</i>	100	100	100	si	100	100	100	si	100	100	100	si
<i>Nm x Nc</i>	100	100	100	si	100	100	100	si	100	100	100	si
<i>Nm x Ns</i>	100	100	100	si	100	100	100	si	100	100	100	si

Na-N aristata; Nl- N. linariaefolia; Nb- N. browalloides; Nv- N. veitchii; Nm- N. micrantha; Ne- N. ericoides; Ns; N. scoparia; Nc- calycina

Tabla 6. Porcentaje promedio de la cantidad de tubos polínicos en tres segmentos del estilo ⁶ en cruzamientos interespecíficos donde *N. scoparia* utilizada como madre.

Promedio												
	observaciones 2005				observaciones 2006				observaciones 2005-2006			
cruzamiento	1° tercio	2° tercio	3° tercio	TP* en ovario	1° tercio	2° tercio	3° tercio	TP* en ovario	1° tercio	2° tercio	3° tercio	TP* en ovario
<i>Ns x Nb</i>	50	*	*	*	*	*	*	*	25	*	*	*
<i>Ns x Nl</i>	100	100	100	si	100	100	100	si	100	100	100	si
<i>Ns x Na</i>	100	80	*	*	100	60	*	*	100	70	*	*
<i>Ns x Nv</i>	100	50	*	*	100	50	*	*	100	50	*	*
<i>Ns x Nm</i>	50	*	*	*	80	*	*	*	60	*	*	*
<i>Ns x Nc</i>	100	50	30	*	50	40	*	*	100	50	35	*
<i>Ns x Ne</i>	100	100	100	si	100	100	100	si	100	100	100	si

Na-N aristata; Nl- N. linariaefolia; Nb- N. browalloides; Nv- N. veitchii; Nm- N. micrantha; Ne- N. ericoides; Ns; N. scoparia; Nc- calycina

Tabla 7. Porcentaje promedio de la cantidad de tubos polínicos en tres segmentos del estilo ⁶ en cruzamientos interespecíficos donde *N. veitichii* utilizada como madre.

cruzamiento	Promedio				Promedio				Promedio			
	observaciones 2005				observaciones 2006				observaciones 2005-2006			
	1° tercio	2° tercio	3° tercio	TP* en ovario	1° tercio	2° tercio	3° tercio	TP* en ovario	1° tercio	2° tercio	3° tercio	TP* en ovario
<i>Nv x Nl</i>	100	80	75	*	100	60	80	*	100	70	80	*
<i>Nv x Na</i>	100	100	100	si	100	100	100	si	100	100	100	si
<i>Nv x Nb</i>	50	*	*	*	50	*	*	*	50	*	*	*
<i>Nv x Nm</i>	50	*	*	*	50	*	*	*	50	*	*	*
<i>Nv x Ne</i>	100	70	50	si	100	50	40	si	100	60	45	si
<i>Nv x Nc</i>	100	60	40	si	100	40	40	si	100	50	40	si
<i>Ne x Ns</i>	100	60	40	si	100	50	40	si	100	65	40	si

Na-N aristata; Nl- N. linariifolia; Nb- N. browalloides; Nv- N. veitichii; Nm- N. micrantha; Ne- N. ericoides; Ns; N. scoparia; Nc- calycina

Tabla 8. Porcentaje promedio de la cantidad de tubos polínicos en tres segmentos del estilo ⁶ (%) en cruzamientos interespecíficos donde *N. browalloides* utilizada como madre.

cruzamiento	Promedio				Promedio				Promedio			
	observaciones 2005				observaciones 2006				observaciones 2005-2006			
	1° tercio	2° tercio	3° tercio	TP* en ovario	1° tercio	2° tercio	3° tercio	TP* en ovario	1° tercio	2° tercio	3° tercio	TP* en ovario
<i>Nb x Nl</i>	100	80	50	si	100	80	50	si	100	80	50	si
<i>Nb x Ne</i>	100	80	50	si	100	80	40	si	100	80	45	si
<i>Nb x Na</i>	100	40	*	*	100	60	*	*	50	50	*	*
<i>Nb x Nv</i>	100	50	*	*	100	50	*	*	50	50	*	*
<i>Nb x Nm</i>	50	*	*	*	50	*	*	*	50	*	*	*
<i>Nb x Nc</i>	100	80	60	si	100	100	50	si	100	90	55	si
<i>Nb x Ns</i>	100	100	50	si	100	100	50	si	100	100	50	si

Na-N aristata; Nl- N. linariifolia; Nb- N. browalloides; Nv- N. veitichii; Nm- N. micrantha; Ne- N. ericoides; Ns; N. scoparia; Nc- calycina

Anexo IV

Caracterización de la progenie segregante
Cuantificación de ADN.
Fertilidad de Híbridos.

Anexo IV - Tabla 1: Promedio de Intensidad relativa de Fluorescencia (IRF) en *N. ericoides*, *N. scoparia*, Híbridos y progenie segregante (Híbridos F2 y retrocruzas).

Origen de la planta a evaluar	Planta	IRF (promedio)	Origen de la planta a evaluar	Planta	IRF (promedio)
<i>N. scoparia</i> x <i>N. scoparia</i>	<i>N. scoparia</i>	0.523525908	híbrido x híbrido	híbrido F2	0.515433024
<i>N. scoparia</i> x <i>N. scoparia</i>	<i>N. scoparia</i>	0.521213907	híbrido x híbrido	híbrido F2	0.521778043
<i>N. scoparia</i> x <i>N. scoparia</i>	<i>N. scoparia</i>	0.538681948	híbrido x híbrido	híbrido F2	0.511818182
<i>N. scoparia</i> x <i>N. scoparia</i>	<i>N. scoparia</i>	0.539977477	híbrido x híbrido	híbrido F2	0.520414381
<i>N. scoparia</i> x <i>N. scoparia</i>	<i>N. scoparia</i>	0.538860104	híbrido x híbrido	híbrido F2	0.526233113
<i>N. scoparia</i> x <i>N. scoparia</i>	<i>N. scoparia</i>	0.529746655	híbrido x híbrido	híbrido F2	0.526315789
<i>N. scoparia</i> x <i>N. scoparia</i>	<i>N. scoparia</i>	0.513031161	híbrido x híbrido	híbrido F2	0.519088868
<i>N. ericoides</i> x <i>N. ericoides</i>	<i>N. ericoides</i>	0.552536443	híbrido x híbrido	híbrido F2	0.510973725
<i>N. ericoides</i> x <i>N. ericoides</i>	<i>N. ericoides</i>	0.562288613	híbrido x híbrido	híbrido F2	0.508841463
<i>N. ericoides</i> x <i>N. ericoides</i>	<i>N. ericoides</i>	0.560200669	híbrido x híbrido	híbrido F2	0.511818182
<i>N. ericoides</i> x <i>N. ericoides</i>	<i>N. ericoides</i>	0.562288613	híbrido x híbrido	híbrido F2	0.520414381
<i>N. ericoides</i> x <i>N. ericoides</i>	<i>N. ericoides</i>	0.559886133	híbrido x híbrido	híbrido F2	0.526233113
<i>N. ericoides</i> x <i>N. ericoides</i>	<i>N. ericoides</i>	0.560288613	híbrido x híbrido	híbrido F2	0.526315789
<i>N. ericoides</i> x <i>N. ericoides</i>	<i>N. ericoides</i>	0.558288613	híbrido x híbrido	híbrido F2	0.521778043
<i>N. ericoides</i> x <i>N. ericoides</i>	<i>N. ericoides</i>	0.562288613	híbrido x <i>N. ericoides</i>	retrocruza	0.551798175
<i>N. scoparia</i> x <i>N. ericoides</i>	híbrido F1	0.566250743	híbrido x <i>N. ericoides</i>	retrocruza	0.539250067
<i>N. scoparia</i> x <i>N. ericoides</i>	híbrido F1	0.558537305	híbrido x <i>N. ericoides</i>	retrocruza	0.537203598
<i>N. scoparia</i> x <i>N. ericoides</i>	híbrido F1	0.543931825	híbrido x <i>N. ericoides</i>	retrocruza	0.523307436
<i>N. scoparia</i> x <i>N. ericoides</i>	híbrido F1	0.536270983	híbrido x <i>N. ericoides</i>	retrocruza	0.539884074
<i>N. scoparia</i> x <i>N. ericoides</i>	híbrido F1	0.549765808	híbrido x <i>N. ericoides</i>	retrocruza	0.558718861
<i>N. scoparia</i> x <i>N. ericoides</i>	híbrido F1	0.547800587	híbrido x <i>N. ericoides</i>	retrocruza	0.55450237
<i>N. scoparia</i> x <i>N. ericoides</i>	híbrido F1	0.529482191	híbrido x <i>N. ericoides</i>	retrocruza	0.586178185
<i>N. scoparia</i> x <i>N. ericoides</i>	híbrido F1	0.533373063	híbrido x <i>N. ericoides</i>	retrocruza	0.574479889
<i>N. scoparia</i> x <i>N. ericoides</i>	híbrido F1	0.5452904	híbrido x <i>N. ericoides</i>	retrocruza	0.552222222
<i>N. scoparia</i> x <i>N. ericoides</i>	híbrido F1	0.603030303	híbrido x <i>N. ericoides</i>	retrocruza	0.543025872
<i>N. scoparia</i> x <i>N. ericoides</i>	híbrido F1	0.554482342	híbrido x <i>N. ericoides</i>	retrocruza	0.554110158
<i>N. scoparia</i> x <i>N. ericoides</i>	híbrido F1	0.541666667	híbrido x <i>N. ericoides</i>	retrocruza	0.549579832

Origen de la planta a evaluar	Planta	IRF (promedio)	Origen de la planta a evaluar	Planta	IRF (promedio)
<i>N. scoparia</i> x <i>N. ericoides</i>	híbrido F1	0.547904192	híbrido x <i>N. ericoides</i>	retrocruza	0.54877369
<i>N. scoparia</i> x <i>N. ericoides</i>	híbrido F1	0.550151976	híbrido x <i>N. ericoides</i>	retrocruza	0.571025134
<i>N. scoparia</i> x <i>N. ericoides</i>	híbrido F1	0.554575859	híbrido x <i>N. ericoides</i>	retrocruza	0.553436185
<i>N. scoparia</i> x <i>N. ericoides</i>	híbrido F1	0.558333333	híbrido x <i>N. ericoides</i>	retrocruza	0.553047404
<i>N. ericoides</i> x <i>N. scoparia</i>	híbrido F1	0.538297872	híbrido x <i>N. ericoides</i>	retrocruza	0.555555556
<i>N. ericoides</i> x <i>N. scoparia</i>	híbrido F1	0.566666667	híbrido x <i>N. ericoides</i>	retrocruza	0.555111365
<i>N. ericoides</i> x <i>N. scoparia</i>	híbrido F1	0.549240122	híbrido x <i>N. ericoides</i>	retrocruza	0.555869074
<i>N. ericoides</i> x <i>N. scoparia</i>	híbrido F1	0.549443758	híbrido x <i>N. ericoides</i>	retrocruza	0.56092734
<i>N. ericoides</i> x <i>N. scoparia</i>	híbrido F1	0.5640553	híbrido x <i>N. ericoides</i>	retrocruza	0.548553423
<i>N. ericoides</i> x <i>N. scoparia</i>	híbrido F1	0.561720698	híbrido x <i>N. ericoides</i>	retrocruza	0.55523755
<i>N. ericoides</i> x <i>N. scoparia</i>	híbrido F1	0.560644346	híbrido x <i>N. ericoides</i>	retrocruza	0.556126821
<i>N. ericoides</i> x <i>N. scoparia</i>	híbrido F1	0.548859935	híbrido x <i>N. ericoides</i>	retrocruza	0.561353211
<i>N. ericoides</i> x <i>N. scoparia</i>	híbrido F1	0.561128527	híbrido x <i>N. ericoides</i>	retrocruza	0.548553423
<i>N. ericoides</i> x <i>N. scoparia</i>	híbrido F1	0.546728972	híbrido x <i>N. scoparia</i>	retrocruza	0.539325843
Híbrido x Híbrido	Híbrido F2	0.52687519	híbrido x <i>N. scoparia</i>	retrocruza	0.532411409
Híbrido x Híbrido	Híbrido F2	0.517873795	híbrido x <i>N. scoparia</i>	retrocruza	0.531034483
Híbrido x Híbrido	Híbrido F2	0.519565217	híbrido x <i>N. scoparia</i>	retrocruza	0.548005908
Híbrido x Híbrido	Híbrido F2	0.505649718	híbrido x <i>N. scoparia</i>	retrocruza	0.534410533
Híbrido x Híbrido	Híbrido F2	0.511104442	híbrido x <i>N. scoparia</i>	retrocruza	0.53663423
Híbrido x Híbrido	Híbrido F2	0.507571169	híbrido x <i>N. scoparia</i>	retrocruza	0.531034483
Híbrido x Híbrido	Híbrido F2	0.527108434	híbrido x <i>N. scoparia</i>	retrocruza	0.548005908
Híbrido x Híbrido	Híbrido F2	0.53021148	híbrido x <i>N. scoparia</i>	retrocruza	0.534410533
Híbrido x Híbrido	Híbrido F2	0.516616314	híbrido x <i>N. scoparia</i>	retrocruza	0.531034483
Híbrido x Híbrido	Híbrido F2	0.506382979	híbrido x <i>N. scoparia</i>	retrocruza	0.531034483
Híbrido x Híbrido	Híbrido F2	0.521804062	híbrido x <i>N. scoparia</i>	retrocruza	0.548005908

IRB = intensidad media de fluorescencia de la muestra/intensidad media de fluorescencia patrón

Anexo IV –Tabla 2: Brotes promedio, Altura y relación brotes/altura de la progenie segregante de híbridos entre *N. scoparia* y *N. ericoides*.

Clon	Promedio de n° de brotes	Altura (cm) promedio	Porcentaje de enraizamiento
1	2.57	0.35	85
2	1.87	0.28	95
3	2.43	0.51	90
4	3.33	0.43	100
5	2.73	0.30	100
6	2.70	0.40	90
7	1.83	0.27	80
8	4.33	0.71	90
9	2.27	0.32	80
10	2.39	0.31	100
11	2.32	0.24	100
12	3.21	0.46	80
13	2.68	0.40	95
14	3.40	0.48	100
15	4.70	0.71	100
16	5.07	1.02	100
17	3.04	0.33	100
18	3.60	0.54	90
19	3.93	0.60	95
20	3.63	0.49	100
21	1.89	0.25	95
22	2.97	0.50	100
23	2.27	0.26	100
24	4.48	0.71	100
25	3.68	0.57	100
26	2.80	0.60	100
27	2.38	0.26	100
28	3.13	0.39	100
29	2.07	0.17	95
30	3.37	0.35	100
31	4.60	0.96	85
32	3.50	0.65	90
33	2.60	0.71	100
34	4.03	0.58	100
35	4.00	0.55	100
36	5.03	0.93	100
37	6.04	1.30	95
38	10.90	2.48	100
39	5.47	1.33	100
40	5.86	1.27	100
41	4.33	0.81	80
42	3.57	0.68	100
43	4.27	0.82	100
44	3.53	0.69	100
45	1.90	0.17	100
46	4.00	0.53	100
47	4.90	0.72	100

	Promedio de n° de brotes	Altura (cm) promedio	Promedio de enraizamiento
48	2.97	0.26	100
49	1.76	0.19	100
50	3.38	0.49	100
51	3.27	0.38	100
52	3.03	0.30	100
53	2.45	0.29	100
54	4.07	0.44	100
55	2.47	0.24	100
56	3.62	0.34	100
57	1.86	0.23	95
<i>N. scoparia</i>	1.60	0.19	80
<i>N. ericoides</i>	2.28	0.43	65

Anexo IV - Tabla 3: Porcentaje de polen no abortados sobre 57 plantas provenientes de la progenie segregantes.

Origen del híbrido	planta	Polen no abortado (%)	Origen del híbrido	planta	Polen no abortado (%)
<i>N. scoparia</i> x <i>N. ericoides</i>	1	97	<i>N. ericoides</i> x <i>N. scoparia</i>	17	95
<i>N. scoparia</i> x <i>N. ericoides</i>	2	92	<i>N. ericoides</i> x <i>N. scoparia</i>	18	90
<i>N. scoparia</i> x <i>N. ericoides</i>	3	63	<i>N. ericoides</i> x <i>N. scoparia</i>	19	34
<i>N. scoparia</i> x <i>N. ericoides</i>	4	73	<i>N. ericoides</i> x <i>N. scoparia</i>	20	96
<i>N. scoparia</i> x <i>N. ericoides</i>	5	92	<i>N. ericoides</i> x <i>N. scoparia</i>	21	73
<i>N. scoparia</i> x <i>N. ericoides</i>	6	94	<i>N. ericoides</i> x <i>N. scoparia</i>	22	95
<i>N. scoparia</i> x <i>N. ericoides</i>	7	97	<i>N. ericoides</i> x <i>N. scoparia</i>	23	36
<i>N. scoparia</i> x <i>N. ericoides</i>	8	91	<i>N. ericoides</i> x <i>N. scoparia</i>	24	46
<i>N. scoparia</i> x <i>N. ericoides</i>	9	69	<i>N. ericoides</i> x <i>N. scoparia</i>	25	91
<i>N. scoparia</i> x <i>N. ericoides</i>	10	98	<i>N. ericoides</i> x <i>N. scoparia</i>	26	93
<i>N. scoparia</i> x <i>N. ericoides</i>	11	98	<i>N. ericoides</i> x <i>N. scoparia</i>	27	88
<i>N. scoparia</i> x <i>N. ericoides</i>	12	98	<i>N. ericoides</i> x <i>N. scoparia</i>	28	88
<i>N. scoparia</i> x <i>N. ericoides</i>	13	96	<i>N. ericoides</i> x <i>N. scoparia</i>	29	95
<i>N. scoparia</i> x <i>N. ericoides</i>	14	92	<i>N. ericoides</i> x <i>N. scoparia</i>	30	68

Origen del híbrido	planta	Polen no abortado (%)	Origen del híbrido	planta	Polen no abortado (%)
<i>N. scoparia</i> x <i>N. ericoides</i>	15	91	<i>N. ericoides</i> x <i>N. scoparia</i>	31	91
<i>N. ericoides</i> x <i>N. scoparia</i>	16	94	<i>N. ericoides</i> x <i>N. scoparia</i>	32	85
			<i>N. ericoides</i> x <i>N. scoparia</i>	33	97

Anexo IV– Tabla 4: Porcentaje de polen no abortados sobre 57 plantas provenientes de las líneas segregantes.

Origen de los individuos analizados	código de plantas	Polen no abortado (%)	origen de los individuos analizados	código de plantas	Polen no abortado (%)
híbrido x <i>N. ericoides</i>	1	85.29	híbrido x híbrido	26	44.37
híbrido x <i>N. ericoides</i>	2	95.53	híbrido x híbrido	27	92.33
híbrido x <i>N. ericoides</i>	3	94.64	híbrido x híbrido	28	69.58
híbrido x <i>N. ericoides</i>	4	93.35	híbrido x <i>N. scoparia</i>	29	67.06
híbrido x <i>N. ericoides</i>	5	78.24	híbrido x <i>N. scoparia</i>	30	98.57
híbrido x <i>N. ericoides</i>	6	50.77	híbrido x <i>N. ericoides</i>	31	70.04
híbrido x <i>N. ericoides</i>	7	82.83	híbrido x <i>N. ericoides</i>	32	95.35
híbrido x <i>N. ericoides</i>	8	72.03	híbrido x <i>N. ericoides</i>	33	93.08
híbrido x <i>N. ericoides</i>	9	37.20	híbrido x <i>N. ericoides</i>	34	81.32
híbrido x <i>N. ericoides</i>	10	49.39	híbrido x <i>N. ericoides</i>	35	96.42
híbrido x <i>N. ericoides</i>	11	67.76	híbrido x <i>N. ericoides</i>	36	84.88
híbrido x <i>N. ericoides</i>	12	90.30	híbrido x <i>N. ericoides</i>	37	67.46
híbrido x híbrido	14	51.33	híbrido x <i>N. ericoides</i>	38	66.64
híbrido x híbrido	15	67.28	híbrido x <i>N. ericoides</i>	39	62.24
híbrido x híbrido	16	69.80	híbrido x <i>N. ericoides</i>	40	66.15
híbrido x híbrido	17	41.59	híbrido x <i>N. ericoides</i>	42	74.88
híbrido x híbrido	18	82.84	híbrido x <i>N. ericoides</i>	44	62.02
híbrido x híbrido	19	89.97	híbrido x <i>N. ericoides</i>	46	91.50
híbrido x híbrido	20	76.43	híbrido x <i>N. ericoides</i>	47	80.79
híbrido x híbrido	21	74.14	híbrido x <i>N. scoparia</i>	48	97.70
híbrido x híbrido	22	80.01	híbrido x <i>N. scoparia</i>	49	92.24

origen de los individuos analizados	código de plantas	Polen no abortado (%)	origen de los individuos analizados	código de plantas	Polen no abortado (%)
híbrido x híbrido	23	46.46	híbrido x <i>N. scoparia</i>	50	64.81
híbrido x híbrido	24	57.26	híbrido x <i>N. scoparia</i>	51	95.44
híbrido x híbrido	25	51.87	híbrido x híbrido	52	92.98
híbrido x híbrido	26	44.37	híbrido x híbrido	53	93.76
híbrido x híbrido	27	92.33	híbrido x híbrido	54	82.06
<i>N. ericoides</i> x <i>N. ericoides</i>	<i>N. ericoides</i>	95.89	híbrido x híbrido	55	95.33
<i>N. scoparia</i> x <i>N. scoparia</i>	<i>N. scoparia</i>	99.88	híbrido x <i>N. ericoides</i>	56	89.12
			híbrido x <i>N. ericoides</i>	57	94.57

Anexo IV – Tabla 5: Promedio de caracteres evaluados en 57 clones selectos de la progenie segregante de híbridos entre *N. scoparia* y *N. ericoides* en estado de plena floración.

Clon	Diámetros de flor (cm)	N° de brotes	Altura (cm)	Diámetros de planta (cm.)
	8	8	8	8
1	3.64	6.1	23.9	30.4
2	3.56	9.1	16.9	25.0
3	3.69	7.7	15.3	35.1
4	3.90	9.3	20.6	29.6
5	7.27	6.7	26.6	24.3
6	3.23	5.7	17.1	30.0
7	3.00	4.4	32.9	32.4
8	3.86	8.3	18.6	25.6
9	3.57	6.3	25.2	25.2
10	3.14	6.1	31.6	30.7
11	3.24	6.4	28.4	24.7
12	4.14	6.4	30.7	14.1
14	1.00	7.1	29.7	22.0
15	2.20	9.0	28.3	17.7
16	1.56	9.0	28.3	17.7
17	1.00	4.6	23.9	10.9
18	3.38	5.9	22.1	22.4
19	3.09	8.6	22.1	27.9
20	3.40	5.6	15.6	24.0
21	3.18	6.7	27.9	18.2
22	3.76	6.5	29.3	29.6
23	3.77	6.0	32.9	27.7
24	1.50	9.1	26.9	18.7

Clon	Diámetro de flor (cm)	N° de brotes	Altura (cm)	Diámetros de planta (cm.)
	8	8	8	8
25	1.77	7.5	23.4	20.6
26	1.95	5.9	23.6	16.5
27	2.76	10.7	21.3	27.7
28	3.23	5.0	24.7	25.4
29	2.96	5.0	25.9	28.8
30	3.50	5.6	22.6	29.9
31	1.00	7.4	23.1	22.0
32	3.11	6.1	19.0	22.4
33	3.11	9.9	18.9	29.9
34	2.83	13.1	24.9	18.7
35	2.89	8.7	14.4	21.4
36	1.00	13.4	15.4	22.4
37	2.06	10.0	20.1	20.4
38	1.59	12.2	16.7	15.9
39	1.64	8.5	22.4	19.4
40	1.74	11.9	21.1	21.7
42	3.02	9.8	14.0	20.3
43	2.16	7.0	21.6	24.4
44	1.91	6.1	16.6	16.6
45	2.94	6.7	27.7	26.6
46	3.47	5.4	26.7	26.7
47	2.64	8.9	23.3	21.9
48	3.96	9.4	28.9	28.7
49	3.48	6.4	25.4	23.6
50	2.14	9.1	23.0	21.6
51	4.13	12.9	27.1	27.3
52	3.80	10.4	20.3	37.0
53	3.51	6.7	14.6	26.0
54	3.06	6.4	28.3	23.0
55	2.87	8.3	18.9	19.9
56	3.17	8.9	29.4	34.0
57	4.03	8.4	17.4	42.0
77	3.56	6.4	18.6	26.0
88	3.39	5.0	28.6	26.7
89	3.30	3.9	24.3	30.6

Anexo IV - Tabla 6: Número de flores promedio de 57 clones selectos de la progenie segregante de híbridos entre *N. scoparia* y *N. ericoides*, en plena floración.

Clon	N° de flores (8)	Clon	N° de flores (8)
1	6.43	30	23.83
2	24.14	31	15.67
3	10.29	32	8.17
4	7.29	33	7.25
5	26.20	34	7.29
6	20.80	35	39.33
7	20.33	36	11.57
8	4.33	37	32.20
9	8.13	38	29.00
10	13.75	39	23.71
11	21.00	40	14.33
12	5.14	41	31.80
14	1.00	42	22.29
15	16.50	44	20.00
16	20.50	45	23.50
17	8.14	46	7.50
18	10.00	47	7.43
19	17.00	48	20.2
20	15.71	49	18.00
21	13.00	50	25.50
22	12.71	51	6.50
23	20.00	52	14.60
24	21.71	53	35.57
25	19.00	54	26.14
26	6.17	55	28.43
27	14.60	56	4.29
28	24.25	57	11.60
29	20.00	<i>N. scoparia</i>	25.00
<i>N. scoparia</i>	28.56	<i>N. ericoides</i>	9.14

Anexo V

Selección de clones

Selección para variedades compactas y flores pequeñas

En el total de plantas caracterizadas se seleccionaron 8 clones, todos con un número de flores por plata (en plena floración) mayor a 20 (Anexo IV- Tabla 4), de las cuales solamente 3 clones (clon 44; clon 39; clon 38) (Anexo V- Tabla 1) presentaron un valor cercano a 1 en la relación Altura/Diámetro de planta formando una arquitectura compacta (Anexo IV- Tabla 4).

Anexo V- Tabla 1: Clones selectos para variedades compactas y flores pequeñas: diámetro de corola 1.5-2 cm; número de flores por planta en plena floración 20-30 y relación Altura/Diámetro de planta 0.8-1.2.

Clon	N° de Flores	Diámetro de corola	Altura de planta	Diámetro de Planta	Relación Alt./Diam.
44	20.00	1.91	16.60	16.60	1.00
39	23.71	1.64	22.40	19.40	1.15
38	29.00	1.59	16.70	15.90	1.05

Selección para variedades compactas y flores grandes

En el total de plantas caracterizadas se seleccionaron 16 clones, de las cuales 6 presentaron una relación Altura/Diámetro de planta cercano a 1 (Anexo IV- Tabla 4), quedando solamente dos clones con un número promedio de flores por planta superior a 20 (Clon 48; clon 5) (Anexo V- Tabla 2).

Anexo V- Tabla 2: Clones selectos para variedades compactas y flores grandes: diámetro de corola 3.5-7cm; número de flores por planta en plena floración 20-30 y relación Altura/Diámetro de planta 0.8-1.2.

Clon	N° de Flores	Diámetro de corola	Altura de planta	Diámetro de Planta	Relación Alt./Diam.
48	20.2	3.9	28.9	28.7	1.00
5	26.2	7	26.6	24.3	1.09

Selección para variedades compactas y flores medianas

En el total de plantas caracterizadas se seleccionaron 16 clones, de los cuales 8 presentaron un número de flores por planta superior a 20 (Anexo IV- Tabla 4), quedando solo tres clones selectos que respondieron a una relación Altura/Diámetro de planta cercano a 1 (Clon 11; clon 28; clon 7) (Anexo V- Tabla3).

Anexo V- Tabla 3: Clones selectos para variedades compactas y flores estándar: Diámetro de corola 3-3.5 cm; número de flores por planta en plena floración 20-30 y relación Altura/Diámetro de planta 0.8-1.2.

Clon	Nº de Flores	Diámetro de corola	Altura de planta	Diámetro de Planta	Relación Alt./Diam.
11	21	3.24	28.4	24.7	1.1498
28	24.25	3.23	24.7	25.4	0.97244
7	20.33	3	32.9	32.4	1.01543

Selección para variedades de porte rastrero

Del total de plantas caracterizadas se seleccionaron 5 clones que presentaban una relación Altura/Diámetro en un rango de 0.4-0.6 (Anexo IV- Tabla 4), de los cuales solamente 2 (clon 53; clon 6) (Anexo V- Tabla 4) con un promedio de flores por plantas mayor de 20 (Anexo IV- Tabla 4). En todos los casos el diámetro de la corola se encontró en un rango superior a 3 cm.

Anexo V- Tabla 4: Clones selectos para variedades de porte rastrero: relación Altura/Diámetro de planta 0.4-0.6, diámetro de corola mayor a 3 cm y número de flores por planta en plena floración 20-30 .

Clon	Nº de Flores	Diámetro de corola	Altura de planta	Diámetro de Planta	Relación Alt./Diam.
53	35.57	3.51	14.6	26	0.56
6	20.8	3.23	17.1	30	0.57

Selección para variedades de porte erecto

Del total de plantas caracterizadas se seleccionaron 5 clones tuvieron una relación Altura/Diámetro mayor a 1.5 (Anexo IV- Tabla 4), de los cuales solamente 3 presentaron un diámetro de corola promedio mayor a 3 cm (Anexo IV- Tabla 4). Visto y considerando que ninguno de los clones tuvo un número promedio de flores mayor a 20, se selecciono un clon con un valor de 16 para dicho carácter (Anexo V- Tabla 5).

Anexo V- Tabla 5: Clones selectos para variedades de porte erecto: relación Altura/Diámetro de planta mayor a 1.5, diámetro de corola mayor a 3 cm. .

Clon	Nº de Flores	Diámetro de corola	Altura de planta	Diámetro de Planta	Relación Alt./Diam.
15	16.5	2.2	28.3	17.7	1.5989

BIBLIOGRAFÍA

- Acosta M C, Ordoñez A del V, Cocucci A A, Moscone E A. 2006.** Chromosome reports in South American *Nicotianeae* (*Solanaceae*), with particular reference to *Nierembergia*. *Annals of the Missouri Garden* 93: 634-346.
- Alexander M P. 1969.** Differential staining of aborted and nonaborted pollen. *Stain Technology* 44 (3) :117-122.
- Aguilar R, Bernardello G, Galetto L. 2002.** Pollen-pistil relationships and pollen size-number trade-off in species of the tribe *Lycieae* (*Solanaceae*). *Journal Plant Research* 115: 335-340.
- Anderson N O and Dunn B. 2003.** Inbreeding depression in seed-propagated *Lilium X-formolongi* imbreds. *ISH Acta Horticulturae* 624:
www.actahort.org/members/showpdf?booknrarnr=624_5
- Anderson N O. 2005.** Breeding Flower Seed Crop. En: McDonald M B and Kwong F Y Eds. *Flower Seeds Biology and technology*. CABI Publishing, 53-86.
- Baker H G, Baker I. 1982.** Starchy and starchless pollen in the Onagraceae. *Annals Molecular Botanical Garden* 69:748-754
- Berger F. 1999.** Endosperm development. *Current Opinion in Plant Biology* 2 (1): 28-32.
- Bremer K. 1994.** Branch support and tree stability. *Cladistics* 10: 295-304.
- Brink R A, Cooper DC. 1939.** Somatoplastic sterility in *Medicago sativa*. *Science* 90: 545-546.
- Brink R A, Cooper D C. 1947.** The endosperm in seed development. *Botanical Review*. 13: 423-541.

- Bruneau A, Starr J R, Joly S. 2007.** Phylogenetic Relationship in the Genus *Rosa*: New Evidence from Chloroplast DNA Sequences and an Appraisal of Current Knowledge. *Systematic Botany* 32 (2): 366-378.
- Buitendijk J H, Boon E J, Ramanna M S. 1997.** Nuclear ADN content in twenty species of *Alstroemeria* L. and some of their Hybrids. *Annals of Botany* 79: 343-353.
- Cheung A Y. 1995.** Pollen-pistil interactions in compatible pollination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92 (8): 3077-3080.
- Cheung A Y, Wang H, Wu H-M. 1995.** A floral transmitting tissue specific glycoprotein attracts pollen tubes and stimulates their growth. *Cell* 82: 383-393.
- Cheung A Y, Wu H-M, Di Stilio V, Glaven R, Chen C, Wong E, Ogdahl J, Estavillo A. 2000.** Pollen-Pistil Interactions in *Nicotiana tabacum*. *Annals of Botany* 85(A): 29-37.
- Clark K R, Okuley J J, Collins P D, Sims T L. 1990.** Sequence variability and developmental expression of S-alleles in self-compatible and pseudo self-compatible *Petunia*. *Plant Cell* 2: 815-826.
- Cocucci A A, Hunziker A T. 1995.** *Flora Fanerógamica Argentina*. Córdoba: Pugliese Siena S.R.L.
- Cooper D C, Brink R A. 1940.** Somatoplastic sterility as a cause of seed failure after interspecific hybridization. *Genetics* 25: 593-617.
- Dinu I I, Hayes R J, Kynast R G, Phillips R L, Thill C A. 2005.** Novel inter-series hybrids in *Solanum*, section *Petota*. *Theoretical and Applied Genetic* 110: 403–415.

- Dolezel J, Lucretti S, Schubert I. 1994.** Plant Chromosome Analysis and Sorting by flow cytometry. *Critical Review in Plant Sciences* 13(3): 275-309.
- Dolezel J, Bartos J. 2005.** Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. *Annals of Botany* 95: 99-110.
- Doyle J J, Doyle J L. 1987.** A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19: 11-15
- Dumas C, Knox R B. 1983.** Callose and determination of pistil viability and incompatibility. *Theoretical and Applied Genetic* 67: 1-10.
- Erazzú L E, Camadro E L, Clausen A M. 1999.** Pollen-Style compatibility relations in natural populations of wild diploid potato species *Solanum spegazzinii* Bitt. *Euphytica* 105: 219-227.
- Escandón A, Pérez de la Torre M, Soto M S, Zelener N, Marcucci Poltri S. 2005.** Identificación de clones selectos de *Nierembergia linariaefolia* mediante microsatélites anclados. *RIA* 34 (1): 5-17.
- Facciuto G, Hagiwara j C, Soto M S, Mata D, Bualo R, Morisigue D, Escandón A, Kamogawa T, Bullrich I. 2004.** Evaluación de plantas nativas herbáceas para uso en cantero. En Actas del II Congreso Argentino de Floricultura y Plantas Ornamentales.
- Facciuto G. 2007.** Auto-incompatibilidad de acción tardía e hibridación en el género *Tabebuia* A. I. Gomes ex DC (*Bignoneaceae*): estudios relacionados con el desarrollo reproductivo. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.
- Farris J. 1983.** The logical basis of phylogenetic analysis. *Advances in Cladistics*. New York: Columbia University Press.

- Farris J. 1989.** The retention index and rescaled consistency index. *Cladistics* 5: 417-419.
- Flower Seed Trials, Michigan State University. Wayside Gardens 1999.** <http://web1.msue.msu.edu/imp/modzz/00000993.html>
- Friedman W E. 1998.** The evolution of double fertilization and endosperm: an “historical” perspective. *Sex Plant Reproduction* 11: 6–16.
- Galen C, Plowright RC. 1987.** Testing the accuracy of using peroxidase activity to indicate stigma receptivity. *Canadian Journal of Botany* 65:107-111.
- Greissl R. 1989.** Vitality analysis of nonadic and polyadic pollen grains using optical contrast-fluorescence microscopy. *Scientific and Technical Information* IX(5): 180-184.
- Godo T, Tsujii O, Ishikawa K, Mii M. 1997.** Fertile transgenic plants of *Nierembergia scoparia* Sendtner obtained by a mikimopine type strain of *Agrobacterium rhizogenes*. *Scientia Horticulturae* 68: 101-111
- Goloboff P A. 1998.** Principios básicos de la cladística. Buenos Aires: *Sociedad Argentina de Botánica*.
- Ghosh S, Shivanna K R. 1984.** Interspecific incompatibility in *Lillium*. *Phytomorphology* 34: 128-135.
- Grossniklaus U, Vielli-Calzada J, Hoepfner M A, Gagliano W B. 1998.** Maternal control of embryogenesis by MEDEA, a *polycomb* group gene in *Arabidopsis*. *Science* 280: 446-450.
- González D. 1997.** El uso de secuencias génicas para estudios taxonómicos. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 60: 137-157.

- Handa T, Kita K, Kurashige Y, Yukawa T. 2003.** Molecular Phylogeny as a guide for Breeding of ornamental: The Case of Study *Menziesia* and *Dendrobium*. *Acta Horticulturae*. 621: 155-163.
- Hanneman R E. 1999.** The reproductive biology of the potato and its implication for breeding. *Potato Research* 42: 283–312.
- Heslop-Harrison Y, Reger B J, Heslop-Harrison J. 1985.** Wide hybridization: pollination of *Zea mays* L. by *Sorghum bicolor* (L.) Moench. *Theoretical and Applied Genetic* 70: 252-258
- Hunziker A T. 2001.** *The Genera of Solanaceae*. Königstein: ARG Gantner Verlag KG .
- Hillis D M, Moris C. 1990.** *Molecular Systematics*. Sunderland: Sinauer
- Horn V. 2002.** Breeding methods and Breeding Research. En: Vainstein A ed *Breeding for Ornamental Plant: Classical and Molecular Approach*, 47-83.
- John H L, Cooper D C. 1958.** Seed Development Following Hybridization Between Diploid Solanum Species from Mexico, Central and South America. *American Journal of Botany* 45 (2): 104-110.
- Johnston S A, Nijs TP, Peloquin S J, Hanneman R E. 1980.** The significance of genic balance to endosperm development in interspecific crosses. *Theoretical and Applied Genetic* 57: 5-9.
- Johnston S A, Hanneman R E. 1982.** Manipulations of Endosperm Balance Number Overcome Crossing Barriers Between. *Science*: 446-448
- Johnston J S, Bennett M D, Rayburn L, Galbraith D W, Price H J. 1999.** Reference standards for determination of DNA content of plant nuclei. *American Journal of Botany* 86 (5): 609-613.
- Johri B M, Ambegaokar K B, Srivastava P S. 1992.** *Comparative Embryology of Angiosperms*. Berlin: Springer-Verlag,

- Judd W. S, Campbell C S, Kellogg E A, Stevens P F, Donoghue M J. 2002.** *Plant Systematics: a phylogenetic approach*. Sunderland: Sinauer.
- Källersjö M, Farris J S, Kluge A G, Bult C. 1992.** Skewness and permutation. *Cladistics* 8:33.
- Kapuscinski J. 1995.** DAPI: a ADN-specific fluorescent probe. *Biotechnic & Histochemistry* 70(5): 220-232.
- Kho Y O, Baër J. 1973.** Improving the cross *Rhododendron impetium* x *Rhododendron* “Elizabeth” by temperature treatment. *Euphytica* 22: 234-238.
- Kluge A G, Farris J S. 1969.** Quantitative phyletics and the evolution of anurans. *Systematic Zoology* 18:1 -32.
- Lanyon S. 1985.** Detecting internal inconsistencies in distance data. *Systematic Zoology*. 54:397-403.
- Lee H J y Cooper D C. 1958.** Seed development following hybridization between diploid Solanum species from Mexico, Central and South America. *American Journal of Botany* 45(4): 104-110
- Lee H S, Huang S, Kao T-H. 1994.** S proteins control rejection of incompatible pollen in *Petunia inflata*. *Nature* 36: 560-563.
- Liedl B, Anderson N. 1994.** Reproductive Barriers: Identification, Uses and Circumvention. *Plant Breeding Reviews* 11: 11-154.
- Lush W M, Clarke A E. 1997.** Observations of pollen tube growth in *Nicotiana glauca* and their implications for the mechanism of self-incompatibility. *Sex Plant Reproduction* 10: 27-35.
- Lush W M, Grieser F, Wolters-Arts M. 1998.** Directional guidance of pollen tubes in vitro and on the stigma. *Plant Physiology* 118: 733-741.

- Lush W M, Spurck T and Joosten R. 2000.** Pollen tube guidance by the pistil of a solanaceous plant. *Annals of Botany* 85 (A):39-47
- Martin R N, 1959.** Staining and observing pollen tubes in the style by means of fluorescence. *Stain Technology* 34: 125-128.
- Masuelli R W and Camadro E L. 1997.** Crossability relationships among wild potato species with different ploidies and Endosperm Balance Numbers (EBN). *Euphytica* 94: 227-235.
- Manzini G, Barcellona M L, Avitabile M, Quadrifoglio F. 1983.** Interaction of diamidino-2-phenylindole (DAPI) with natural and synthetic nucleic acids. *Nucleic Acids Research*. 11(24): 8861–8876.
- Mayer U, Buttner G, Jurgens C. 1993.** Apical-basal pattern formation in the *Arabidopsis* embryo: studies on the role of *gnom* gene. *Development* 117: 149-162.
- Mione T, Olmstead R G, Jansen R K, Anderson G J. 1994.** Systematic implications of chloroplast DAN variation in *Jaltomata* and selected physaloid genera (*Solanaceae*). *American Journal of Botany* 81: 912-918.
- Mishiba K, Ando T, Mii Watanabe H, Kokubum H, Hashimoto G, Marchesi, E. 2000.** Nuclear DNA content as an Index Character Discriminating Taxa in the Genus *Petunia sensu Jussie* (*Solanaceae*). *Annals of Botany* 85: 665-673
- Morgenstern B A, Dress A, Werner T. 1996.** Multiple DNA and protein sequence alignment based on segment-to-segment comparison. *Proceedings of the National Academy of Science* 93: 12098-12103.
- Nettancourt de D. 2005** *Incompatibility and Incongruity in Wild and Cultivated Plants*. Berlin: Springer.

Nettancourt de D, Devreux M, Leri U, Bozzini A, Cresti M, Pacini E, Sarfatti G.

1974 Genetical and Ultrastructural Aspects of self and cross Incompatibility in interspecific Hybrids between Self-Compatible *Lycopersicon esculentum* and Self-Incompatible *L. peruvianum*. *Theoretical and Applied Genetic* 44: 278-288.

Nixon K C, Carpenter J M. 1993. On outgroups. *Cladistics* 9: 413-426.

Olmstead R G, Palmer J D, 1992. A chloroplast DAN phylogeny of the *Solanaceae*: subfamilial relationships and character evolution. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 79: 346-360.

Olsen R T, Ranney T G, Vilorio Z. 2006. Reproductive Behaviour of Induced Allotetraploid x *Chitalpa* and In vitro Embryo Culture of Polyploid progeny. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 13(6):716-724

Otto F J. 1990. DAPI staining of fixed cells for high-resolution flow cytometry of nuclear DNA. In: Darzynkiewicz Z, Cissman HA, eds. *Methods in cell biology*. San Diego: Academic Press.

Pandey K K. 1962. Interspecific incompatibility in *Solanum* species. *American Journal of Botany* 49 (8): 874-882.

Pandey K K. 1969. Elements of the S-gene complex. V. Interspecific cross compatibility relationship and theory of the evolution of the S complex. *Genetic* 40: 447-474.

Palmer J D, Zamir D. 1982. Chloroplast DAN evolution and phylogenetic relationships in *Lycopersicon*. *Proceeding of the National of Academy Sciences*. 79: 5006-5010

Pérez de la Torre M, Escandón A, Hagiwara JC, Miyajima I. 2004. Construcción de un perfil de identificación de nuevas variedades de *Tecoma* mediante

microsatélites anclados. *II Congreso Argentino de Floricultura y Plantas Ornamentales. VI Jornada de Floricultura*, Buenos Aires, Argentina.

Pfossier M, Amon A, Lelley T, Heberle-Bors E. 1995. Evaluation of Sensitivity of Flower Cytometry in Detecting Aneuploidy in Wheat Using Disomic and Ditelosomic Wheat-Rye Addition Lines. *Cytometry* 21: 387-393.

Quarin C L. 1999. Effect of pollen source and pollen ploidy on endosperm formation and seed set in pseudogamous apomictic *Paspalum notatum*. *Sex plant Reproduction* 11: 331-335.

Shaw J, Lickey E B, Beck J T, Farmer S B, Liu W, Miller J, Siripum K C, Winder C T, Schilling E E, Small R L. 2005. The Tortoise and the hare II: relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis. *American Journal of Botany* 92(1): 142-166

Shifriss C. 1997. Male sterility in pepper (*Capsicum annuum L.*). *Euphytica* 93:83–88

Shivanna K R, Sastri D. 1981. Stigma-surface esterases and stigma receptibility in some taxa characterized by wet stigma. *Annals of Botany* 47: 53-64.

Shivanna K R, Johri B M. 1985. The Angiosperm Pollen: structure and Function. New Delhi: Wiley Eastern.

Shivanna K R, Rangaswamy N S. 1992. *Pollen biology: A Laboratory Manual*. Berlin: Springer-Verlag.

Shivanna K R, Ram H Y. 2005. Contribution of Panchanan Maheshwari's school to angiosperm embryology through an integrative approach. *Current Science* 89: 1820-1834.

- Shivanna K R. 2005.** Barriers to hybridization. En: Shivana, k R Sawhney V K. eds. *Pollen biotechnology and Crop Production and Improvement*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Sijacic P, Wang X, Skirpan A L, Wang Y, Dowd P E, McCibbin A G, Huang S, Kao T H. 2004.** Identification of the pollen determination of S-Rnase-mediated self-incompatibility. *Nature* 429(6989)
- Sin S F, Yeung E C, Chye M L. 2006.** Downregulation of *Solanum americanum* genes encoding proteinase inhibitor II causes defective seed development. *The Plant Journal* 45: 58-70.
- Shizukawa Y, Mii M. 1997.** A simple and efficient plant regeneration system for leaf protoplasts of *Nierembergia repens* by inducing single shoots on the microcolonies. *Plant Cell Reports* 16:545-549.
- Soto S, Miyajima I, Bullrich L, Mata D, Facciuto G, Serpa J C, Hagiwara J C, Morisigue D. 2004.** Evaluación de cuatro clones selectos de *Nierembergia linariaefolia* desarrolladas en Argentina bajo condiciones de producción. En *Acta II Congreso Argentino de Floricultura y Plantas Ornamentales*, Buenos Aires, Argentina.
- Soto M S, Bullrich L, Mata D, Facciuto G, Serpa J C, Hagiwara J C, Morisigue D, Miyajima I, Kobayashi N. 2005.** New clones of *Nierembergia linariaefolia* obtained from population native to Argentina. *Acta Horticulturae* 683: 407-410
- Soto S, Neumann R, Facciuto G, Hagiwara J C, Nishiyama K, Escandón A, Suárez E. 2003.** Recolección de especies con valor ornamental en el Noroeste. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*. 38
- Steven P F. 1986.** Evolutionary classifications in botany, 1960-1985. *Journal of the Arnold Arboretum* 67: 313-339

- Suarez E, Nishiyama K, Facciuto G, Escandòn A, Soto S, Hagiwara J C, Mata D, Miyajima I, Kobayashi N. 2003.** The Horticulture development Project INTA-JICA. *V International Symposium on New Floriculture Crops*. Iguazu-Fall. Brasil.
- Sun Y, Zhang X, Nie Y, Guo X, Jin S, Liang S. 2004.** Production and characterization of somatic hybrids between upland cotton (*Gossypium hirsutum*) and cotton (*G. Klotzschianum* Anders) via electrofusion. *Theoretical and Applied Genetic*. 109 (3): 472-479
- Sundberg E, Landgren M, Glimeluis. 2004.** Fertility and Chromosome stability in *Brassica napus* resynthesised by protoplast fusion. *Theoretical and Applied Genetic*. 75 (1): 96-104
- Taberlet P, Gielly L, Pautou G, Bouvet J. 1991.** Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast ADN. *Plant Molecular Biology*. 17: 1105-1109.
- Takayama S, Osogai A. 2005.** Self-incompatibility in plants. *Annual Review of Plant Biology* 56: 467-489.
- Thompson J D, Lumaret R. 1992.** The evolutionary dynamics of polyploid plants: origins, establishment and persistence. *Trends Ecology Evolution* 7:302–307
- Torres C. 2002.** Pollen size evolution: correlation between pollen volume and pistil length in *Asteraceae*. *Sex Plant Reproduction* 12: 365-370.
- UF Trail Garden. 2006.** University of florida.
<http://hort.ufl.edu/floriculture/trialgarden/htm/J36.htm>.

- Van Tuyl M, Lim K B, Ramanna M S. 2002.** Interspecific Hybridization and Introgression. Ed. A. Vainstein, *Breeding for Ornamental Plant: Classical and Molecular Approach*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 85-103.
- Van Tuyl J M, De Jeu M J. 2005.** Methods for overcoming interspecific crossing Barriers. En: Shivana, k R Sawhney V K. Eds. *Pollen biotechnology and Crop Production and Improvement*. Cambridge: Cambridge University Press, 273-292.
- Wakasugi T, Sugita M, Tsudzuki T, Sugiura M. 1998.** Updated gene map of Tobacco chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology Reproduction* 16: 231-241.
- Wang H, Wu H-M, Cheung A Y. 1993.** Development and pollination regulated accumulation and glycosylation of a style transmitting tissue-specific proline-rich protein. *Plant Cell* 5: 1639-1650.
- Wheeler M J, Franklin-Tong V E, Franklin F C H. 2001.** The molecular and genetic basis of pollen-pistil interactions. *New Phytologist* 151:565-584
www.newphytologist.com
- Wilkins H, Anderson N O. 2006.** Creation of New Floral Products. Annualization of perennials. Horticulture and commercial Significance. En: Anderson N O ed. *Flowers Breeding and Genetic. Issues, Challenges and Opportunities for the 21st Century*. Minnesota: Springer.
- Willimas E G, Knox R B, Rouse J L. 1982.** Pollination sub-systems distinguished by pollen tube arrest after incompatibility interspecific crosses in *Rhododendron* (Ericaceae). *Journal Cell Science*. 53: 255-277.
- Wu H-M, Wang H, Cheung A Y. 1995.** A floral transmitting tissue specific glycoprotein attracts pollen tubes and stimulates their growth. *Cell* 82: 383-393.

Zinkl G M, Preuss D. 2000. Dissecting Arabidopsis pollen-stigma interactions reveals novel mechanisms that confer mating specificity. *Annals of Botany* 85(A): 15-21.

Zuloaga F O, Morrone O. 1999. *Catálogo de las Plantas Vasculares de la República Argentina II.* Missouri: Missouri Botanical Garden press.