

DIFERENCIACIÓN GENÉTICA E HIBRIDACIÓN EN ESPECIES DEL GÉNERO *BACCHARIS* L.



Alejandro Vaco

Orientador: Pablo Speranza

Universidad de la República
Facultad de Ciencias

Montevideo Uruguay 2011

Universidad de la República
Facultad de Ciencias

**DIFERENCIACIÓN GENÉTICA E
HIBRIDACIÓN EN ESPECIES DEL
GÉNERO *BACCHARIS* L.**

Alejandro Vaco

Orientador: Pablo Speranza

Tesis presentada para acceder al título de Licenciado en Ciencias
Biológicas
Montevideo Uruguay 2011

Orientador: Pablo Speranza
Tribunal: Cristina Mazzella
Mauricio Bonifacino
Pablo Speranza

Referencias foto carátula

Angulo superior izquierdo y derecho, ángulo inferior derecho:

cercanías del Salto del Penitente, departamento de Lavalleja

Angulo inferior izquierdo: Mata de B. Crispa (al frente) y B trimera (atrás), ruta 109, departamento de Maldonado.

Centro: Abajo a la izquierda, planta de B trimera, al centro B.

Crispa, y al fondo B. Spp “carquejón”, Ruta 60, departamento de Maldonado

Agradecimientos

Al Dr. Pablo Speranza por sus consejos y su guía

A la Msc Magdalena Vaio por sus aportes a este trabajo y por su amistad

A los integrantes del tribunal:

La Dra. Cristina Mazzella y el Dr. Mauricio Bonifacino por sus oportunos aportes y correcciones

A todos los compañeros del laboratorio de genética y de biotecnología por hacer del lugar de trabajo un ambiente acogedor

A mi novia Natalie

A mis hermanas

A mi tía, que esperó la concreción de este trabajo con más ansias que yo.

Contenido

Introducción.....	6
Las plantas medicinales	6
Perspectiva histórica	6
Las Asteráceas medicinales	6
La “carqueja” como especie medicinal	7
Especies e Hibridación	8
Especies y ecotipos	8
La hibridación en la especiación vegetal	9
Los marcadores Moleculares	10
Definición y comentario histórico	10
Marcadores moleculares co-dominantes y dominantes	11
Marcadores cloroplásticos	12
Herramientas teóricas asociadas a los marcadores moleculares.....	13
Comparación de genotipos individuales (Band based aproach).....	13
Estimación de Frecuencias alélicas y estructura poblacional.....	16
Diversidad génica	17
Distancia genética.....	18
Detección de híbridos	19
Hibridación en las “carquejas”	20
Objetivos.....	22
Objetivos generales.....	22
Objetivos específicos.....	22
Materiales y métodos:.....	22
Material Vegetal	22
Extracción de ADN	23
Amplificación del ADN para la técnica de ISSR	24
Análisis de los datos	24
Amplificación de fragmentos cloroplásticos	25
Resultados.....	26
Colecta	26
Puesta a punto del Cebador	26
Diversidad y estructura.....	28
Distancias	29
Coordenadas principales.....	30
Análisis de la Varianza	31
Amplificación del Fragmento cloroplástico psbA-trnH	32
Discusión	33
Conclusiones.....	36
Referencias	38

Introducción

Las plantas medicinales

Perspectiva histórica

Las plantas medicinales han fascinado al hombre desde siempre por sus capacidades curativas y el poder que el conocimiento de éstas adjudica a quien los posea. Ya desde épocas remotas vemos plasmado este interés en obras como “*De materia medica*” de Pedanios Dioscórides (ca. 60 d.C.), médico de los emperadores romanos Nerón y Vespasiano. Esta publicación constituyó la principal referencia hasta el renacimiento, y en ella enumera cerca de 600 especies vegetales y sus usos prácticos (Osbaldeston 2000). El uso de las plantas medicinales con finalidad terapéutica (fitoterapia), pasó de ser la primera opción a ocupar un segundo plano debido al desarrollo de la medicina en el siglo XIX. Luego, a fines del siglo XX, se ve un retorno a estas terapias debido al descubrimiento de los efectos secundarios de los fármacos de síntesis, el mejor conocimiento de los principios activos vegetales y el desarrollo de nuevos métodos que aseguran la calidad y la trazabilidad de los productos (FUNDAQUIMet *al.* 2005). Los principales productores en el rubro de las plantas medicinales son los países en desarrollo, y los principales consumidores, los países desarrollados. El volumen de dicho comercio se estimó en 2005 en 12.000 millones de dólares al año, y el 90 % de todo este volumen proviene de colectas de poblaciones silvestres (FUNDAQUIMet *al.* 2005). Debido a este auge la Organización Mundial de la Salud, sugiere a los países miembros profundizar la investigación en los principios activos vegetales, la sistemática de las plantas medicinales nativas y la sustentabilidad de su uso (WHO 2003). En Uruguay hay una gran tradición de fitoterapia, y dentro de esta tradición las especies de la familia Asteraceae figuran entre las más importantes (Paz *et al.* 1992).

Las Asteráceas medicinales

La familia Asteraceae cuenta con ca. 25000 especies desde hierbas a árboles, de distribución cosmopolita y muchas especies de importancia económica, como por ejemplo: “achicoria” (*Chicorium intybus* L.), “alcaucil” (*Cynara cardunculus* L.), “girasol” (*Helianthus annuus* L.), “lechuga” (*Lactuca sativa* L.), “diente de león” (*Taraxacum officinale* F.H. Wigg.), y “tarragón” (*Artemisia dracunculus* L.) entre otras (Judd *et al.* 2002). En Uruguay la familia Asteraceae posee varias especies medicinales nativas como “cepa caballo” (*Xanthium spinosum* L.), “marcela” (*Achyrocline satureioides* (Lam.) DC), “yerba carnícera” (*Conyza bonariensis* (L.) Cronquist), y “carqueja” (*Baccharis trímera* (Less.) DC) (Paz *et al.* 1992). La especie más estudiada en Uruguay

es *Achyrocline satureioides*, para la cual existen trabajos en los que se demuestra el efecto reparador que la infusión presenta ante el daño oxidativo en cultivos celulares (Arredondo *et al.* 2004). Interesantemente, a partir de estas investigaciones se liberó un producto comercial a base de las propiedades de los extractos de esta especie.

Otro género importante es *Baccharis* L., éste se extiende desde el sur de Estados Unidos hasta el sur de Argentina y cuenta con ca. 400 especies, las cuales exhiben una importante diversidad morfológica y ocupan una gran variedad de ambientes (Giuliano 2001). Los estudios en la región reportan 96 especies para Argentina (Giuliano 2001) y 120 para Brasil (Barroso 1976), mientras que para Uruguay se citan 42 especies (Zuloaga *et al.* 2008). En estudios infra-genéricos, *Baccharis* se ha dividido en 8 a 15 secciones, basadas en caracteres morfológicos (Giuliano 2001). De todas estas secciones, *Baccharis* sect. *Caulopterae* DC, contiene arbustos de tallos alados, y capítulos sésiles, agrupados en espigas o racimos, comúnmente denominadas “carquejas”. En Uruguay el género *Baccharis* sect. *Caulopterae* cuenta con al menos siete especies: *B. trimera*, *B. crispa* Spreng., *B. articulata* (Lam.) Pers., *B. genistifolia* DC, *B. microcephala* (Less.) DC, *B. phyteumoides* (Less.) DC y *B. sagittalis* (Less.) DC. *Baccharis trímera* es un arbusto sub-leñoso de aproximadamente 40-70 cm de altura, con tallos ramificados, tri-alados, alas de borde entero, de color verde claro y con hojas muy reducidas. Por otro lado *Baccharis crispa* presenta un porte menor, ca. 40-60 cm de altura, tallos menos ramificados, tri-alados, alas de borde crespado y color más oscuro (Lombardo 1983; Cortadi *et al.* 1999). Se considera que la taxonomía de esta sección es complicada y aunque se han utilizado características morfológicas y anatómicas (Cortadi *et al.* 1999; Budel *et al.* 2003; Rodríguez *et al.* 2008), la definición de algunas de sus especies y los límites entre éstas no están del todo resueltos (Budel 2003, Giuliano 2001, Mangiaterra 2005, Rodríguez *et al.* 2007, Simões-Pires *et al.* 2005).

La “carqueja” como especie medicinal

Muchas especies del género *Baccharis* presentan propiedades medicinales (Abad *et al.* 2006), en el caso de las “carquejas” el conocimiento vernáculo les adjudica propiedades hepato-protectoras y digestivas entre otras. A nivel científico se han demostrado para *Baccharis trimera* varias actividades de sus extractos, por ejemplo su capacidad anti-inflamatoria (Paul *et al.* 2009), actividad anti-diabética (Oliveira *et al.* 2005), propiedad anti-geno-tóxica (Rodrigues *et al.* 2009), e inhibidor de actividades hemorrágicas, edematosas, proteolíticas y mio-tóxicas de venenos de serpientes (Januário *et al.* 2004).

Aun teniendo en cuenta las diferencias morfológicas mencionadas en la sección anterior entre *Baccharis crispa* y *B. trimera*, es difícil distinguir ciertas plantas en el campo debido a su morfología intermedia. Esto ocasiona que los colectores artesanales comercialicen bajo el nombre de “carqueja” varias especies distintas, ya que es particularmente difícil o imposible reconocerlas luego de su molienda para comercializar. Se ha sugerido que estas especies pueden ser diferenciadas por el marcador químico Acetato de Carquejil presente únicamente en *B. trimera* (Simoes-Pires 2005). Paralelamente, otro trabajo propone lo mismo, agregando el Ledol a la lista de químicos marcadores de *B. trimera* (Mangiaterra 2005). Sin embargo trabajos posteriores demuestran que esto no es confiable, debido a la gran variación estacional en la composición química de estas especies (Lago *et al.* 2008, Silva *et al.* 2007). También los marcadores morfológicos se usan para distinguirlos (Cortadi *et al.* 1999, Rodríguez *et al.* 2008) pero no hay consenso al respecto. El problema de distinguir estas especies de manera rápida y eficaz sigue planteado, y una alternativa posible son los marcadores de ADN, ya que no son afectados por el ambiente o la fenología del individuo.

Especies e Hibridación

Especies y ecotipos

El concepto de especie en biología es usado y ampliamente conocido desde el siglo XVII, pero la discusión acerca de si estas entidades realmente existen o son un artefacto para organizar el conocimiento se profundiza en el siglo XX con la “Síntesis Moderna”. Esta propone que la especie no difiere de otras agrupaciones de individuos simplemente por su inclusividad, sino que también por “tipo”, es una categoría distinta, básica en la organización de la vida (de Queiroz 2005). El concepto de especie existe para toda la gama de organismos o entidades relevantes para la biología, desde los virus (Gibbs & Gibbs 2006) hasta aves y mamíferos (Futuyma 1998). La clásica formulación del concepto biológico de especie presentada por Ernst Mayr (1942) (Futuyma 1998), la cual define a la especie como “... grupos de poblaciones naturales real o potencialmente interfértiles, las cuales están aisladas reproductivamente de otros grupos análogos” cumple una función heurística ya que su cobertura de la diversidad biológica es incompleta (Beurton 2002). González-Forero (2009) analiza el concepto biológico de especie de Mayr, encontrando que éste tiene dos componentes, el componente de cohesión y el componente de aislamiento y demuestra que relajando la restricción de la cohesión solo se logra que cualquier grupo sea una especie, pero relajando la restricción del aislamiento se logra que este concepto abarque más organismos y sea más flexible. En general los conceptos concuerdan en ver a la especie como un “linaje de meta-

poblaciones”, solo difieren en las propiedades que exigen para hablar de especie. Cuando dos “linajes de meta-poblaciones” divergen, se distinguen tres etapas: al principio no hay duda de que son la misma especie, luego los linajes cumplen algunos criterios de especie pero no otros, finalmente se cumplen todos y de nuevo hay unanimidad para considerarlos como dos especies distintas (de Queiroz 2005).

Una categoría que está relacionada con la de especie es el eco-tipo. Los eco-tipos dentro de una especie son “genotipos distintos que surgen por adaptación a condiciones locales, y son capaces de cruzarse entre si” (Hufford 2003), de manera que su existencia implica la selección natural. En plantas, mutaciones eco-tipo-específicas pueden afectar caracteres fenológicos o fisiológicos importantes como el momento de floración y la germinación o la respuesta fotosintética de los individuos (Abrahams *et al.* 1992, Sanda & Amasino 1996, Nordborg & Bergelson 1999), y de esta manera impedir el flujo génico.

Si los eco-tipos se mantienen separados por barreras ecológicas por cierto tiempo pueden desarrollar incompatibilidad reproductiva (Lu & Bernatchez 1998), lo que eventualmente podría derivar en la especiación, ya que hay una relación clara entre divergencia de nicho ecológico y aislamiento reproductivo (Nosil *et al.* 2008). Sin embargo no necesariamente los eco-tipos divergen hasta quedar aislados reproductivamente, se puede considerar la posibilidad de que dos variantes (morfológicas, ecológicas, alélicas) se mantengan en simpatría por el mismo mecanismo que la selección natural divergente mantiene más polimorfismo de lo esperado en poblaciones naturales (Tian 2002, Kreitman & Aguadé 1986).

La hibridación en la especiación vegetal

En el siglo XVIII el botánico alemán Joseph Kolreuter realiza experimentos de hibridación y descubre que la mayoría de sus híbridos son estériles y plantea que difícilmente se den en la naturaleza. En el siglo XIX los botánicos Charles Víctor Naudin y Antón Kerner plantean el fenómeno como algo común en la naturaleza y en el siglo XX la hibridación se usa extensamente en mejoramiento genético de especies vegetales (Riesberg & Carney 1998). Actualmente la hibridación inter-específica y otros fenómenos que derivan de ésta (captura de cloroplastos, introgresión), se reconocen como fenómenos frecuentes en las especies vegetales (Riesberg & Soltis 1991), que no están distribuidos de forma uniforme entre los grupos taxonómicos. En general algunas familias (Rosaceae, Asteraceae, Poaceae) albergan la mayoría de los casos de dicho fenómeno, y dentro de esas familias, en una porción pequeña de los géneros se dan la mayoría de

los casos, sin una relación notoria con el tamaño de dichos grupos (Ellstrand *et al.* 1996). Los grupos de plantas en los que se ha observado mayor frecuencia de hibridación suelen estar representados por plantas perennes, alógamas obligadas o que presentan alguna forma de reproducción vegetativa. Dentro de estos grupos, las Asteraceae se encuentran entre las familias con mayor frecuencia de híbridos (Ellstrand *et al.* 1996). Otro factor citado como promotor de la hibridación, es la acción modificadora de las actividades humanas (Lamont *et al.* 2003, Neuffer *et al.* 1999).

Los resultados de la hibridación pueden ser diversos, por ejemplo, la aparición de caracteres intermedios o parentales en los híbridos F1 depende del tipo de herencia de dicho carácter. En general se espera que los caracteres multi-génicos presenten un patrón intermedio, mientras que los caracteres con herencia simple presenten estados parentales o intermedios dependiendo de la relación entre los alelos, por tanto los híbridos serán mosaicos de estados (Fritz *et al.* 1994). Una tercera opción es la aparición de estados extremos o nuevos, lo cual sucede en algunos casos y podría ser la fuente de variación para la selección natural (Riesberg & Ellstrand 1993). Teóricamente se predice que en promedio los híbridos tendrían menor adaptación que los padres, pero es posible que al menos algunos estén mejor adaptados que ambos padres al mismo ambiente que éstos (Barton 2001). En estudios de resistencia a herbívoros en parentales e híbridos, se observó que estos últimos podían ser más susceptibles, intermedios, iguales a uno u otro padre o más resistentes que ambos padres, en orden de mayor a menor frecuencia (Fritz *et al.* 1994, Fritz 1999). La hibridación también juega un papel importante en la conservación de especies y diversidad, sobre todo en situaciones donde una especie muy distribuida y con grandes poblaciones se hibrida con otra de pequeñas poblaciones, ya que ha sido mencionado el riesgo de la pérdida del genotipo menos frecuente (Lorenze-Lemke *et al.* 2006)

Los marcadores Moleculares

Definición y comentario histórico

Los marcadores moleculares son caracteres hereditarios con múltiples estados, que reflejan diferencias en la secuencia del ADN (Snnucks 2000). De la misma manera que los marcadores morfológicos o citogenéticos permiten describir y caracterizar poblaciones y/o individuos, con la excepción de que los marcadores moleculares se basan directamente en las diferencias en la secuencia del ADN, mientras que en los marcadores morfológicos esta diferencia se asume (Rentarías 2007). El advenimiento de la electroforesis de enzimas en la década de los 70 resuelve disputas como el enfrentamiento entre las corrientes de “clásicos” que defendían un modelo de

homocigosis casi total para todos los loci, y los “balanceados” cuya visión implicaba loci altamente polimórficos (Lewontin 1991). También en la década del 1970 surgen técnicas como la secuenciación del ADN (Sanger & Coulson 1974), pero estas técnicas no son implementadas de manera masiva hasta muchos años después. A principios de los '90 aparecen marcadores de más fácil aplicación como los RAPD (Williams *et al.* 1990, Welsch & McClelland 1990) o ISSR (Zietkiewicz *et al.* 1994) que permiten la generación rápida de datos y requieren poco conocimiento previo del genoma de las especies, lo que los diferencia de marcadores como los microsatélites que si bien dan más información, requieren una etapa previa de generación de los mismos.

Marcadores moleculares co-dominantes y dominantes

Los marcadores co-dominantes permiten distinguir los heterocigotos de los homocigotos dominantes. Dentro de estos marcadores se encuentran los microsatélites, los RFLP (Restriction Fragment Length Polimorphism), isoenzimas y en algunos casos los marcadores dominantes. Estos últimos se pueden comportar como co-dominantes cuando el polimorfismo entre alelos es una diferencia de tamaño y algún estudio previo confirma que son variantes alélicas (Williams *et al.* 1990). Los marcadores co-dominantes más usados son los microsatélites, el uso de estos marcadores surge de la idea de que los repetidos de di, tri o tetra-nucleótidos puedan albergar variabilidad de la misma manera que los repetidos de motivos más grandes (minisatélites) lo hacen (Litt & Luty 1989). El desarrollo de la técnica implica diseñar cebadores que flanqueen estos repetidos para relevar en electroforesis polimorfismos de longitud en los mismos.

Los marcadores moleculares dominantes (i.e.: no distinguen entre heterocigotos y homocigotos dominantes), incluyen los AFLP (Amplified Fragment Length Polimorphism), RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) e ISSR (Inter Simple Sequence Repeats), entre los más utilizados. La técnica AFLP surge en 1995 y consiste en amplificar fragmentos resultantes de la restricción del ADN con enzimas. Específicamente la técnica consiste en la digestión del ADN con dos enzimas de restricción, se unen los fragmentos a adaptadores cortos y complementarios a los extremos generados por las enzimas y se amplifican estos segmentos con cebadores que en su secuencia son complementarios al sitio de restricción y al adaptador. El polimorfismo será en general de tipo presencia ausencia del sitio de restricción. Para lograr marcadores co-dominantes con esta técnica se requiere de análisis de segregación (Vos *et al.* 1995). Los RAPD se basan en reacciones de PCR con cebadores de 10 pares de bases, esto genera bandas siempre que el cebador encuentra sitios de apareamiento en sentido contrario y en hebras opuestas a una distancia tal que se pueda amplificar, debido al pequeño tamaño de los cebadores son poco reproducibles (Penner 1993) Los marcadores

ISSR tienen origen en la técnica conocida como *Alu*-PCR, en la cual se usan cebadores complementarios a secuencias repetidas tipo SINEs (Short Interspersed Elements), en este caso elementos *Alu*, de manera que se amplifican los fragmentos comprendidos entre los repetidos generando un polimorfismo. De esta manera los ISSR hacen uso de cebadores complementarios a secuencias repetidas tipo microsatélites, y amplifican las regiones comprendidas entre estos repetidos, como se esquematiza en la figura 1.



Figura 1. Unión de los cebadores de ISSR. En el esquema se ven en gris ambas cadenas desapareadas de un fragmento de ADN genómico, en los extremos de la cadena se ven los repetidos tipo microsatélites. En barras verticales se representa el extremo 3' del cebador que en su zona 5' es complementario al motivo repetido. La zona en negro es el fragmento que es finalmente amplificado. El extremo 3' (barras verticales) se denomina “ancla”, puede o no estar en el cebador, en caso de estar puede ir en el extremo 3' o 5' y reduce el número de amplicones 4 veces por cada base.

Los cebadores tienen una estructura dada por el motivo repetido en el extremo 5' y puede tener o no un “ancla” en el extremo 5' o en el 3', esta secuencia es capaz de discriminar cuales secuencias serán amplificadas, simplificando el patrón de bandas a visualizar en el gel (Zietkiewicz et al 1994,). Los cebadores tienen una longitud de aproximadamente 20 nucleótidos, lo que les da una mayor reproducibilidad y especificidad que la reportada para otras técnicas como los RAPD (Bornet & Branchard 2001).

Marcadores cloroplásticos

La genética de los cloroplastos nace en 1909 cuando Erwin Baur y Carl Correns publican simultáneamente descubrimientos sobre la herencia no mendeliana de ciertas especies, luego en 1963 se separa el ADN cloroplástico mediante centrifugación en gradientes de Cloruro de Cesio (Hagemann 2000). En el año 1971 Manning y colaboradores observan su estructura circular en el microscopio electrónico, para 1976 se construye el primer mapa físico del genoma cloroplástico y en 1977 se clona el primer gen cloroplástico (Sugiura 1992). Finalmente en 1986 se secuencian el genoma cloroplástico del tabaco (Shinozaki et al 1986). Este genoma en promedio de 160 Kb tiene aproximadamente 100 genes y una estructura circular con dos repetidos invertidos y dos secuencias

de copia única. Las secuencias más usadas para análisis filogenético son algunos de estos genes y secuencias inter-génicas, que varían en el tipo y la velocidad de mutación (Shaw 2005).

En general todas las secuencias disponibles han experimentado un gran aumento en su uso desde la década del '90 (Taberlet et al 1991), siendo las más usadas el intrón trnL-trnL el espaciador intergénico trnL-trnF y secuencias del gen matK. El fragmento psbA-trnH separa el gen de la proteína de 32 KD Q2 o D1 del foto-sistema II (Sugiura 1992) y el ARN de transferencia del aminoácido histidina que lleva el anti-codón GUG, este fragmento se encuentra cerca del límite entre uno de los repetidos invertidos y la secuencia grande de copia única. Se ha reportado que esta secuencia tiene una alta prevalencia de mutaciones tipo inserciones/deleciones (indels) (Aldrich et al 1988). Los marcadores cloroplásticos al ser generalmente heredados por la vía materna pueden ayudar a reconstruir una parte importante de la historia de los organismos que complementa a los marcadores nucleares (Speranza et al 2007).

Herramientas teóricas asociadas a los marcadores moleculares.

Las técnicas moleculares y sobre todo los marcadores moleculares usados a nivel poblacional hacen uso de herramientas teóricas para obtener información de las muestras, que permiten inferir los procesos que ocurren en las poblaciones. Dos estrategias se distinguen en la literatura a la hora de realizar estudios de tipo poblacional. Una implica la estimación de las frecuencias alélicas poblacionales y el posterior cálculo de parámetros que permitan dividir la varianza entre unidades o calcular distancias entre poblaciones, se conoce como “Frequency Based Approach”. La otra se basa en la comparación de genotipos individuales, se la conoce como “Band Based Approach” (Bonin et al 2007a). El primer método se usa de forma directa con marcadores dominantes en individuos haploides y con cierta dificultad para diploides, o con marcadores codominantes e individuos haploides o diploides. El segundo método se usa para marcadores dominantes y co-dominantes en individuos haploides y diploides (Kosman & Leonard 2005). Otros cálculos útiles son las distancias genéticas y las estimaciones de diversidad.

Comparación de genotipos individuales (Band based approach)

Gower (1971) distingue varios tipos de caracteres, dicotómicos, cualitativos y cuantitativos, los primeros con dos estados posibles y las dos últimas clases con varios estados posibles. Propone que la similitud entre dos individuos “j” e “i”, para un carácter k, (s_{ijk}), puede tomar un valor cero cuando estos individuos son distintos y tomar valor de una fracción positiva o 1 si presentan algún

grado de coincidencia. También define una variable δ_{ijk} que toma valor 1 si es posible la comparación entre estos individuos para este carácter, y cero si no se pueden comparar. Para un total de v caracteres la similitud total entre los individuos sería

$$S_{ijk} = \sum s_{ijk} / \sum \delta_{ijk}$$

Este coeficiente para el caso de caracteres dicotómicos toma valor de 1 si los individuos coinciden en todos los caracteres, o cero si no coinciden en ninguno. Para el caso de caracteres cuantitativos se define

$$s_{ijk} = 1 - (|x_i - x_j| / R_x)$$

donde " x_j " y " x_i " son los valores tomados por los individuos j e i , y R_x es el rango de valores del carácter en la población o en la muestra.

Se ve que a partir de este coeficiente definido, si se trabaja con caracteres dicotómicos sin tomar en cuenta las ausencias en común, el coeficiente toma la forma conocida como coeficiente de Jaccard:

$$\text{Jaccard: } J = a / (a + b + c) \quad (\text{Bonin et al 2007a})$$

Y si se toman las ausencias en común tanto para caracteres dicotómicos como para caracteres cualitativos toma la forma del coeficiente de "Simple Matching"

$$\text{Simple Matching: } S = (a + d) / (a + b + c + d) \quad (\text{Bonin et al 2007a})$$

Donde la letra "a" representa presencia de banda en ambos individuos, las letras "b" y "c" presencia en uno y ausencia en el otro y la letra "d" ausencia en ambos. Un tercer coeficiente usado es el coeficiente de Dice

$$\text{Dice: } D = 2a / (2a + b + c) \quad (\text{Bonin et al 2007a})$$

En este coeficiente se está claramente dando más peso a los caracteres coincidentes sobre los demás.

En el caso de individuos haploides y marcadores codominantes, Kosman & Leonard (2005) demuestran que para individuos haploides y marcadores codominantes el coeficiente de Dice y el

Simple Matching son idénticos y con los individuos diploides y marcadores co-dominantes estos autores proponen

$$as(i1, i2) = 1/n \sum as(A1j, A2j)$$

donde n es el número de loci, y $as(A1j, A2j)$ es la distancia entre los individuos $i1$ e $i2$ para un locus j , la sumatoria es para todos los loci. Esta medida propuesta por Kosman & Leonard para medir disimilitud presenta algunas ventajas sobre las medidas más comunes, por ejemplo, de acuerdo con este cálculo la disimilitud entre un par de individuos AA-AB y un par AB-AC es de $1/2$ en ambos casos, pero para el coeficiente de Jaccard la disimilitud entre AA-AB = $1/2$, y d AB-AC = $1/3$, no hay ningún argumento genético para asumir que el par AA-AB es mas disímil que el par AB-AC.

En cuanto a los marcadores dominantes para los individuos haploides, el problema se reduce a la inclusión o no de las ausencias en común, para lo cual el criterio sugerido por estos autores es que para especies cercanas se use la información aportada por las ausencias en común, mientras que para especies lejanas no. Para los individuos diploides se suma otro problema, que es la imposibilidad de distinguir homocigotos dominantes de heterocigotos (Williams et al 1990). Kosman & Leonard recomiendan en estos casos procedimientos que estiman parámetros poblacionales asumiendo equilibrio Hardy-Weinberg (frecuencias génicas, diversidad y disimilitud promedio entre individuos) como el método de Lynch & Milligan (Lynch & Milligan 1994). A parte de casos de especies con alto nivel de autogamia, tal que se puede asumir homocigocis en la mayoría de los loci y tratarlos como haploides, podría no haber ningún método confiable para estimar similitud entre individuos, por tanto estos análisis deberían ser interpretados con cautela (Kosman & Leonard 2005). En otros trabajos sugieren que los análisis de individuos diploides con marcadores dominantes sean realizados con conciencia de lo que estos marcadores pueden aportar, ya que distintos estimadores de F_{st} muestran una gran variación (Bonin et al 2007a), y la práctica de sacar conclusiones poblacionales a partir de análisis de componentes principales y árboles basados en matrices de distancia, con marcadores dominantes puede llevar a conclusiones erróneas (Hollingsworth & Ennos 2004). De estos datos se extrae la conclusión de que los trabajos en los cuales no es posible seguir al pie de la letra las recomendaciones de la literatura, deben considerarse como meramente exploratorios.

Estimación de Frecuencias alélicas y estructura poblacional

Los estadísticos más populares de la genética de poblaciones probablemente sean los estadísticos de Wright, definidos como las correlaciones en el muestreo de los alelos de los individuos en los distintos niveles jerárquicos de la población en una meta población infinita (Nei 1977). En 1977 Nei demuestra que estos estadísticos se pueden escribir como cocientes de heterocigosis y para poblaciones finitas, en esta forma son rápidamente interpretables.

$$Fit = (H_t - H_i) / H_t \quad (1)$$

$$Fis = (H_s - H_i) / H_s \quad (2)$$

$$Fst = (H_t - H_s) / H_t \quad (3)$$

Donde H_t es la heterocigosis esperada para toda la meta-población si ésta estuviera en equilibrio Hardy-Weinberg, H_i es la heterocigosis observada promediada para todas las sub poblaciones y H_s es la heterocigosis esperada para las sub poblaciones si éstas estuvieran en equilibrio Hardy-Weinberg. Claramente Fis mide la disminución en la frecuencia de heterocigotos en las sub-poblaciones debido al inbreeding propio de las mismas, Fst mide la contribución de la subdivisión poblacional a la desviación de lo esperado, y Fit mide la disminución en heterocigosis de los individuos con respecto a la meta-población (Hartl & Clark 1989).

Las estimaciones de diversidad génica y las medidas indirectas de flujo génico basadas en los datos de isoenzimas comenzaron a generarse en la década del '60 (Neigel 1997) y se han seguido usando (Hamrick & Godt 1997). Basándose en un modelo demográfico y genético, se calculaba el valor de Fst , y a partir de éste se llegaba a conocer Nm , donde N es el número poblacional y m la fracción de migrantes que llega a la sub-población. El modelo demográfico es el llamado “modelo de islas infinitas”, el cual es una adaptación del modelo “isla-continente” de Wright (Gillespie 1998). En dicho modelo la población está afectada por flujo génico desde una población infinitamente grande, en el caso de las “islas infinitas” el conjunto de todas las poblaciones finitas se considera infinito, y son éstas las que afectan a cada sub población con alelos nuevos a una tasa de Nm individuos por generación. Un resultado de este modelo es la ecuación que calcula la probabilidad de que dos alelos sean idénticos por estado en una situación de equilibrio

$$G_{eq} = 1 / (1 + 4Nm)$$

A partir de esta ecuación se puede llegar a la conocida ecuación que vincula el estadístico F_{st} y el flujo génico entre poblaciones

$$F_{st} = 1 / (1 + 4Nm)$$

Y de aquí se puede estimar Nm .

Otras estrategias para estimar flujo génico son similares y simplemente utilizan estadísticos análogos al F_{st} (G_{st} , θ_{st} , R_{st}) (Nei 1973, Cockerham & Weir 1984, Slatkin 1995). Estas aproximaciones son extensamente usadas y de la misma manera son criticadas por la ambigüedad de la interpretación de los resultados y también por lo poco realista de las condiciones asumidas en los modelos (Bossart & Prowel 1998). El F_{st} es también tan dependiente de parámetros demográficos y genéticos que ha llevado a autores a conclusiones opuestas acerca de la precisión del estadístico (Neigel 2002).

Diversidad génica

Conocer la diversidad génica puede ser útil a la hora de tomar medidas de conservación debido a la relación entre diversidad y viabilidad evolutiva de las poblaciones, y en mejoramiento genético, para el manejo de los recursos (Bonin *et al.* 2007b). Las medidas más usadas para evaluar la diversidad génica son el porcentaje de loci polimórficos y la heterocigosidad promedio por locus (Nei 1987). La heterocigosidad por locus se puede definir como

$$h = 1 - \sum (x_i^2)$$

donde “ x_i ” es la frecuencia del alelo i , y promediando h para n loci se obtiene la heterocigosis promedio, este valor está definido para poblaciones con apareamiento al azar, por tanto no tiene el mismo significado para una especie autógama, por ésto se la suele llamar “diversidad génica”. Otra estrategia usada en conservación para medir diversidad es usar loci con valor adaptativo, como por ejemplo el “índice adaptativo poblacional”, el cual detecta loci sujetos a selección en poblaciones pareadas en ambientes distintos y basa la selección de poblaciones a conservar en la maximización de la diversidad de estos alelos adaptativos (Bonin *et al.* 2007b).

Distancia genética

La distancia genética es el grado de diferencias genéticas entre poblaciones o especies que es medida por una cantidad numérica (Nei 1987). Los tipos de datos más usados para estimarlas son secuencias aminoácídicas, secuencias nucleotídicas, y frecuencias alélicas (Xia 2002).

Muchos cálculos usados en algún momento como distancias basadas en frecuencias alélicas, aparecen originalmente para caracteres morfológicos, como en el caso de la distancia de Czekanowski publicada en 1909 para caracteres cuantitativos pero que se puede aplicar a frecuencias de genes:

$$Cz = 1/m \sum |X_i - Y_i|$$

Donde m es el número de alelos y X_i e Y_i son las diferencias de frecuencias del alelo i en las poblaciones X e Y respectivamente, se nota que si todas las frecuencias son iguales esta distancia vale cero y si las poblaciones están fijadas para distintos alelos vale 1. A la hora de manejar especies o poblaciones muy emparentadas no se puede dejar de notar el efecto del polimorfismo intra-especie o intra-poblacional, para considerar esto Nei propone la “mínima distancia genética” (D_m), para la que define X_i e Y_i como las frecuencias para el alelo A_i en las poblaciones X e Y , la probabilidad de que dos alelos elegidos al azar en las dos poblaciones sean idénticos es:

$$J_{xy} = \sum X_i Y_i,$$

y diferente

$$d_{xy} = 1 - J_{xy}.$$

También se nota que hay una probabilidad de que dentro de la misma población X los alelos sean distintos, esto es $d_x = \sum X_i^2$, y para la población Y (d_y) es igual, así la distancia corregida es $d = d_{xy} - (d_x + d_y) / 2$, esto promediado para todos los loci vale

$$D_m = D_{xy(m)} - (D_{x(m)} + D_{y(m)}) / 2$$

Se denomina “mínima distancia genética” (Nei 1987) debido a que si las poblaciones presentan mucho polimorfismo interno el valor de D_m tendrá un sesgo hacia valores menores.

Nei responde a estos sesgos con la “distancia genética estándar”, definida como

$$D = - \ln I$$

$$I = J_{xy} / (J_x J_y)^2,$$

I varía entre 0 y 1, mientras que D entre 0 e ∞ .

Detección de híbridos

Según lo recopilan Hegarty y Hiscock (2005), la detección de híbridos se basaba inicialmente en la observación de caracteres morfológicos y posteriormente el apareamiento de los cromosomas en la meiosis o su morfología. A medida que las herramientas moleculares y teóricas mencionadas antes se desarrollan, las isozimas y los RFLP pasan a ser utilizados y más tarde la variación de secuencia, al mismo tiempo que también lo hacen los microsatélites y las secuencias cloroplásticas. Posteriormente los marcadores se hacen más sencillos en cuanto a su accesibilidad y los RAPD e ISSR son la elección para un rápido relevamiento de híbridos, de todos modos algunos autores recomiendan combinar varios marcadores distintos (Hegarty & Hiscock 2005). Otras estrategias exploran diferencias de conformación en ADN copia (cDNA SSCP) y también recientemente la citogenética está aportando información a través de las técnicas moleculares como son FISH y GISH (Friesen *et al.* 1997), logrando detectar e identificar tanto cromosomas extraños como secuencias extrañas dentro de los genomas (Iovene *et al.* 2007, Dong *et al.* 2001).

Mirando con más detenimiento la literatura que hace uso de marcadores dominantes, ISSR o RAPD, para detectar híbridos, se observan distintas estrategias. Una forma de hacerlo es buscando marcadores específicos de cada parental en zonas donde solo se encuentren formas morfológicamente puras, y buscar en los potenciales híbridos los perfiles aditivos que se esperan para estos marcadores. Esto es lo que encuentran Daehler y Strong (1997), Riesberg y Gerber (1994) y Neuffer *et al.* en 1999, pero se usan criterios distintos para definir bandas especie específicas. Los primeros trabajos usan solo las bandas que aparecen en el 100 % de las muestras de dicha especie y en ninguna de las muestras de la otra, por otro lado Neuffer y colaboradores usan las bandas que aparecen en al menos el 75 % de una especie y en ninguna de las muestras de la otra especie. En otros trabajos se usa el mismo principio pero en una versión más cuantitativa ya que no siempre se encuentran bandas específicas, en estos casos se diseñan “índices de hibridación” basados en frecuencias de bandas. Estos índices toman como valores extremos los obtenidos para las poblaciones referencia asignadas claramente a una u otra especie o valores de uno a cero, ya

que, en general (Burgess *et al.* 2005, González-Rodríguez *et al.* 2004) son probabilidades generadas por un método de máxima verosimilitud. Con los ISSR, Wolfe *et al.* (1998) confirman potenciales procesos de hibridación mediante la observación de bandas especie-específicas, lo mismo hacen Ducarme y Wesselingh (2005), generando un índice que consiste en contar para una muestra presencias de marcadores de la especie y de ausencias de marcadores de la otra especie. De esta manera el índice de un individuo puro de la primer especie tendrá un valor igual al número de marcadores específicos de ambas especies, mientras que un individuo de la segunda especie tendrá un índice de valor cero, los híbridos serán intermedios. Otros trabajos usan zonas híbridas paralelas para distinguir entre dos procesos, por un lado la generación “*in situ*” de eco-tipos en cada sitio de manera independiente, o la llegada de cada eco-tipo por separado con posterior flujo génico por contacto secundario (Panova *et al.* 2006).

Hibridación en las “carquejas”

La estrategia de buscar bandas específicas de cada especie (Daehler & Strong 1997, Riesberg & Gerber 1994) se puede adaptar para un caso en el cual no hay extremos, debido a que las poblaciones no forman parte de una gran zona híbrida en cuyos extremos están las formas puras. Un indicador de hibridación podría ser la existencia de bandas compartidas por ambas especies pero únicas de cada sitio. En caso de que no se encuentren bandas específicas de cada sitio, la distancia genética puede ser una versión continua de esta estrategia para resolver este problema. En el caso de Pannova (Pannova *et al.* 2006) se analizan zonas híbridas paralelas en islas, y este planteo permite distinguir situaciones como la hibridación y el contacto secundario. Según este planteo metodológico si los pares de poblaciones surgen a partir de la fragmentación o colonización de las dos especies originales, sería como en el modelo A (figura 2), donde se ve que la distancia intra-específica es menor que la distancia inter-específica. Para este modelo sería posible encontrar marcadores comunes a las poblaciones de la especie 1 en los tres sitios, y que no estuvieran en ninguna población de la especie 2. En el caso de que una sola población original colonice o se fragmente en los tres sitios, y se generen morfo-tipos, ecológicos en paralelo, como en el modelo B (figura 3), las distancias entre poblaciones de un mismo sitio serán menores que las distancias entre poblaciones de distinto sitio. Básicamente, encontrar distancias cortas entre las poblaciones de la misma especie permite descartar el modelo B, pero encontrar distancias cortas entre poblaciones de distinta especie del mismo sitio, puede ser explicado por el modelo B o el modelo A con flujo génico en T2, éste es el problema de distinguir flujo génico por contacto secundario de la intergradación primaria (Durrett 2000).

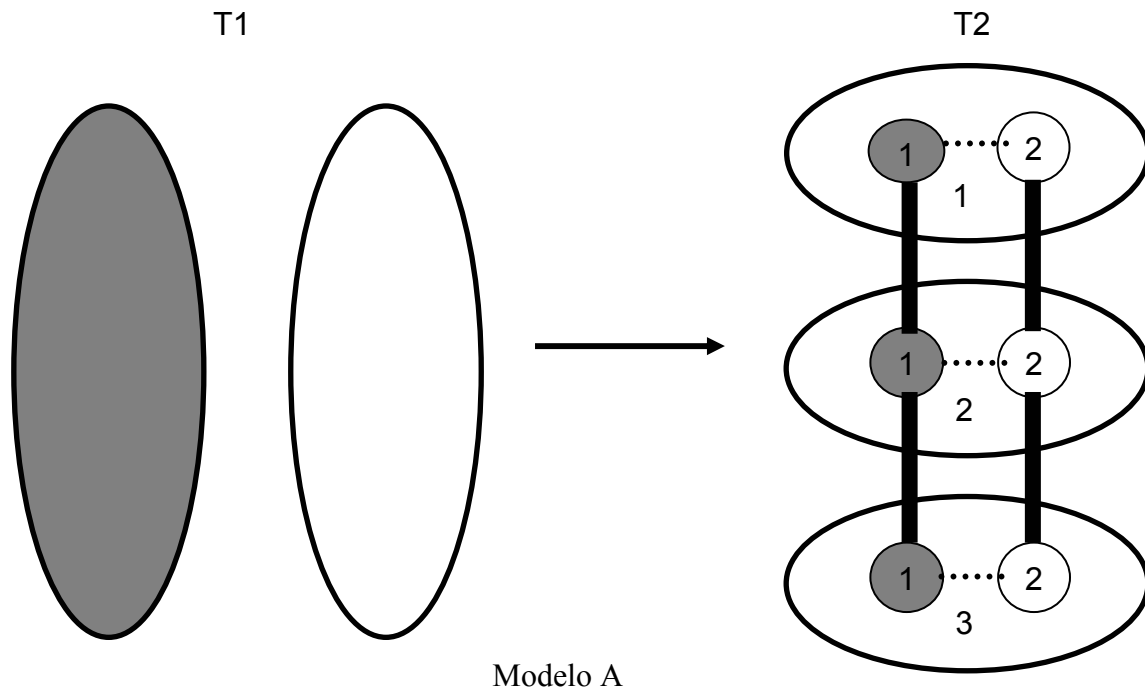


Fig. 2. Fragmentación sin flujo génico. En este modelo las poblaciones de ambas especies se representan como círculos, en dos momentos, T1 y T2, y las distancias se representan con líneas que conectan las poblaciones. En T2 las poblaciones originales se fragmentan o colonizan 3 sitios, debido a que en T1 ya son especies distintas las distancias intra-específicas (línea entera) son más cortas que las inter-específicas (línea punteada).

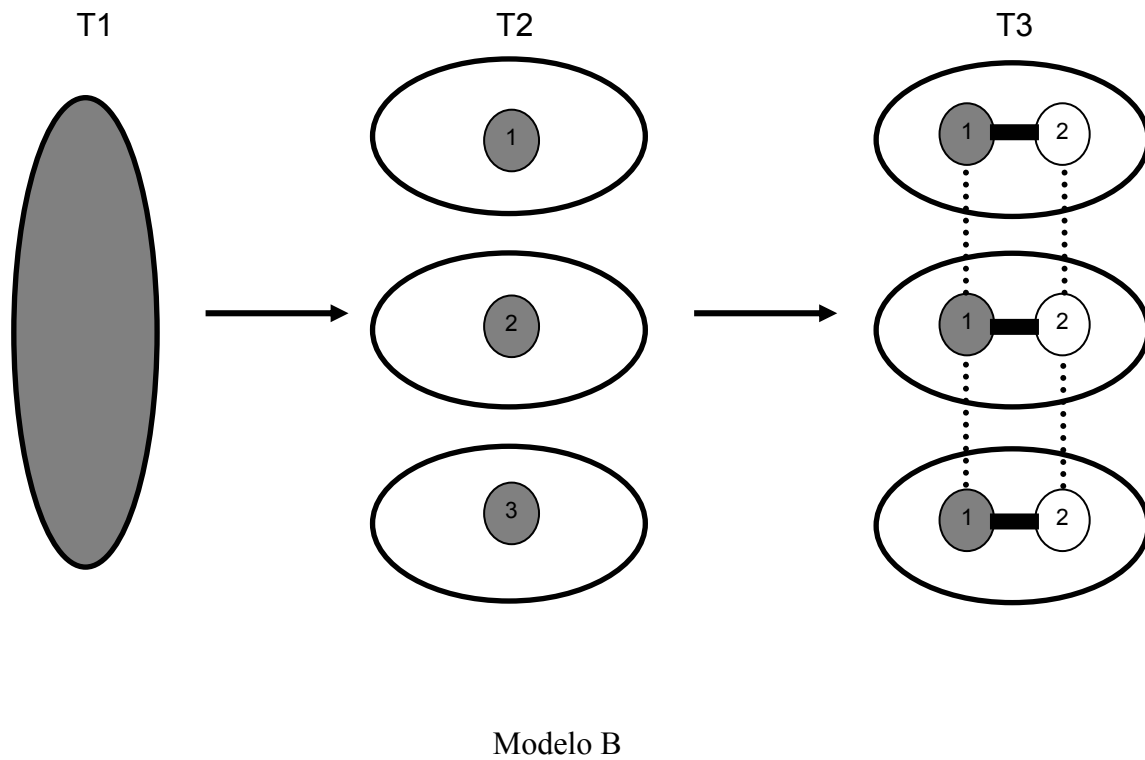


Fig. 3 Diferenciación ecológica. En este modelo una especie original (círculo coloreado) se fragmenta ó coloniza 3 sitios, y en T2 se generan 2 morfo-tipos en cada sitio, esto implica que las distancias entre poblaciones del mismo sitio (línea entera) serán menores que las distancias entre sitios (líneas punteadas).

Objetivos

Objetivos generales

Determinar el número de especies del género *Baccharis* sect. *Caulopterae* presentes en Uruguay y clarificar la sistemática de las especies de dicho grupo, con especial énfasis en las especies blanco de consumo humano.

Objetivos específicos

Detectar la presencia de flujo génico entre poblaciones de *B. crispa* y *B. trimera*

Materiales y métodos:

Material Vegetal

Las colectas del material vegetal se realizaron en la zona de serranías al Este del país en tres sitios donde existen poblaciones de *Baccharis trimera* y *B. crispa* en simpatría, sitio 1: ruta 60 Km. 29.5 (34° 37' 20.98" S, 55°15'10.6" W, 150 metros sobre el nivel del mar), sitio 2: Salto del Penitente (ruta 8 Km.125 (34°22'51.34" S, 55°04'36.18" W, 330 metros sobre el nivel del mar) sobre una formación conocida como “Cerros del Penitente” y sitio 3: ruta 109 entre Iguá y Rocha (34°20'29.86" S, 54°37'43.53" W, 310 metros sobre el nivel del mar), en la formación conocida como “Sierra de Carapé” (fig. 4). En cada sitio mencionado se colectaron 30 individuos de la población existente de *B. crispa* e igual número de individuos de la población de *B. trimera*. De modo que las poblaciones 1C y 1T corresponden al sitio 1, y son *B. crispa* y *B. trimera* respectivamente, para el sitio 2 las poblaciones son 2C y 2T y para el sitio 3 son 3C y 3T. La ubicación geográfica de los sitios y la estimación de las distancias geográficas entre sitios se realizaron con Google Earth.



Figura 4. Mapa con la ubicación de los tres sitios de colecta y las distancias entre los sitios.

Se colectaron trozos de tallo de 15 individuos femeninos y masculinos de cada especie en cada una de las tres poblaciones, que fueron conservados en sílica gel hasta la posterior extracción del ADN. Los criterios utilizados en la colecta para diferenciar las especies son los mencionados en la introducción. La diferenciación entre sexos se basa en la identificación de estambres o pistilos en las flores por lo que las colectas se realizaron durante la floración, en los meses de febrero y marzo. Las accesiones se conservan en sílica gel en el Laboratorio de Genética en la Facultad de Agronomía.

Extracción de ADN

Las extracciones de ADN se llevaron a cabo mediante el protocolo CTAB de Doyle y Doyle (1987), con algunas modificaciones. Para la molienda del tejido (10-20mg) se utilizó nitrógeno líquido. Durante la precipitación del ADN se agregó acetato de amonio 7.5 M junto con el iso-propanol, y la precipitación se llevó a cabo a -20° C. Luego de ésto se realizó un lavado extra con etanol 95% y se

re-suspendió el ADN en agua mili-Q. El ADN fue corrido en geles al 0.8 % de agarosa y Buffer TBE (90 mM Tris, 90 mM ácido bórico, 20 mM EDTA PH 8). La cuantificación consistió en comparar las bandas de ADN genómico presentes en el gel unas con otras de forma cualitativa.

Amplificación del ADN para la técnica de ISSR

El ADN genómico fue amplificado mediante PCR utilizando 4 cebadores, los cuales fueron probados para ver sus perfiles de amplificación, teniendo como criterio el número de bandas generadas, la separación entre bandas y la intensidad de las bandas. Después de probar dichos cebadores fue seleccionado el cebador ISSR6 con la secuencia GACA (4), para el análisis de los 3 sitios por ser el que mejor cumplió con los criterios antes mencionados. Para cada uno de los 3 sitios se amplificaron 30 individuos de *B. crispa* y 30 individuos de *B. trimera* con la técnica de ISSR, con un protocolo básico de amplificación. Las reacciones se llevaron a cabo en 20 µl de volumen total, con 0.65 Unidades de enzima Taq polimerasa, 1X buffer de reacción, 2 mM MgCl, 0.15 mM dNTPs, y 1.25 µM del cebador, el volumen de ADN fue de 2 µl. Las reacciones de amplificación, de ISSR se realizaron en un termo-ciclador Thermo Electrón Corporation, PX2 Thermal Cycler, y el programa consistió en un protocolo de disminución progresiva de la temperatura de re-naturalización: 5 min a 95° C, 1 min a 94° C, 1 min a 58 ° C disminuyendo 1 grado por ciclo hasta llegar a 53° y 2 min a 72° C, por 45 ciclos seguidos por una amplificación final de 5 min a 72°C. En todos los experimentos se incluyeron controles negativos consistentes en un tubo con la mezcla general pero sin agregado de ADN.

Los productos de PCR fueron separados en geles de agarosa al 1.5 % en Buffer TBE (90 mM Tris, 90 mM ácido bórico, 20 mM EDTA PH 8) y fue utilizada una escala Gene Ruler ADN Ladder Mix (Fermentas) como marcador del tamaño de los distintos fragmentos. Los fragmentos de ADN fueron identificados por tinción con Bromuro de Etidio y la documentación se realizó con un sistema de captura equipado con una cámara Canon Power Shot A630. Las imágenes fueron posteriormente procesadas con el programa Corel Photo Paint versión 12, y el análisis de los geles se realizó con el programa Crosschecker 4.7.

Análisis de los datos

Una vez generada la matriz de asignación de presencia o ausencia de bandas se procedió a eliminar ciertos marcadores. Dentro de los marcadores a priori asignados, se eliminaron los que estaban sistemáticamente presentes en los blancos, y los que aparecían en frecuencias muy bajas, para eliminar aquellos que pudieran ser artefactos de la técnica. Los análisis estadísticos se realizaron

con varios programas de distribución libre. Las distancias entre poblaciones se calcularon en el software POPGENE 1.31 (Yeh 1997). La representación gráfica de los individuos y las poblaciones, mediante la representación gráfica de las respectivas matrices de similitud o distancia, se realizaron en el software FMAD 1.1β (Schluter & Harris 2006). Este software permite elegir entre 3 coeficientes de similitud, Jaccard, Dice y Simple Matching, así como entre la Distancia Euclidiana, o la Distancia de Nei para sitios de restricción (Nei 1979). Para el análisis de coordenadas principales de cada sitio se usaron los coeficientes de Jaccard y Simple Matching, pero se muestran los resultados de Jaccard ya que ambos dieron resultados similares, para el análisis de coordenadas principales de las poblaciones se usó la distancia poblacional de Nei. La descomposición de la varianza genética se analizó a través del AMOVA (Excoffier 1992), en el software GenAlEx 6.2 con 9999 permutaciones.

Amplificación de fragmentos cloroplásticos

Previo a la elección del fragmento psbA-trnH se probaron las regiones trnT-trnL y dos regiones dentro del espaciador trnL-trnF (Taberlet *et al.* 1991), siendo usada la única que presentó polimorfismo. Para cada uno de los tres sitios de colecta se amplificó dicho fragmento en todos los individuos de *B. crispa* y *B. trimera*.

Para la amplificación de la región cloroplástica psbA-trnH se utilizaron cebadores descritos previamente (Sang *et al.* 1997). Los fragmentos cloroplásticos se amplificaron en un volumen total de 12 µl, con 0.24 U de enzima Taq polimerasa, 1X de buffer de reacción, 1.5 mM de MgCl, 0.1 mM de dNTPs y 0.40 µM de cada cebador. Las reacciones de amplificación se realizaron en el mismo termo-ciclador y el programa de amplificación fue el mismo utilizado en las reacciones de ISSR. En todos los experimentos se incluyeron controles negativos consistentes en un tubo con el mix general pero sin agregado de ADN.

Los productos de PCR fueron separados en geles de agarosa al 1.5 % en Buffer TBE (90 mM Tris, 90 mM ácido bórico, 20 mM EDTA PH 8) y fue utilizada una escala Gene Ruler 1Kb ADN Ladder como marcador del tamaño de los distintos fragmentos. Los fragmentos de ADN fueron identificados por tinción con Bromuro de Etidio y la documentación se realizó como fue descrito anteriormente. Las imágenes fueron posteriormente analizadas con el programa Corel Photo Paint versión12.

Resultados

Colecta

En la salida de colecta se pudieron diferenciar las especies de acuerdo a lo mencionado en la literatura (fig 5). Se observó que *Baccharis trimera* se encuentra ampliamente distribuida a lo largo de la zona recorrida, mientras que *B. crispera* se localizó en zonas puntuales asociadas a afloramientos rocosos. En todos los sitios la población de *B. crispera* estaba rodeada por la población de *B. trimera*, que en todos los casos eran más extensas que las de *B. crispera*.



Figura 5. Diferencias morfológicas entre *B. trimera* (flecha blanca) y *B. crispera* (flecha negra).

Puesta a punto del Cebador

El resultado de la puesta a punto del cebador “ISSR 6” seleccionado por su alto número de bandas (resultados no mostrados) determinó las condiciones que se usaron para las amplificaciones sucesivas. En la figura 6 se muestra la puesta a punto para la concentración de ADN y de enzima Taq polimerasa, los individuos fueron seleccionados al azar y claramente la disminución de enzima a 0,65 unidades y el uso de bajas concentraciones de ADN resultó en perfiles más claros,

menor “ruido” de fondo y menor proporción de reacciones falladas. El número de marcadores es de 40, todos los marcadores fueron polimórficos para todas las poblaciones. Ciertos marcadores aparecen en un solo sexo, de la misma manera otros lo hacen en una sola especie o población, pero nunca aparecieron en frecuencias tales para ser considerados diagnósticos. Para *Baccharis crispa* se encontraron 4 marcadores presentes en individuos masculinos que no estaban presentes en individuos femeninos y solo un marcador presente en individuos femeninos que raramente estaba presente en los individuos masculinos. En *B. trimera*, 7 marcadores presentes en los individuos masculinos no aparecieron en los individuos femeninos, por otro lado se encontraron 5 marcadores presentes en individuos femeninos que estaban ausentes en individuos masculinos. *B. crispa* y *B. trimera* presentaron marcadores únicos de cada especie pero éstos no cumplen con los requisitos encontrados en la literatura para ser considerados especie específicos.

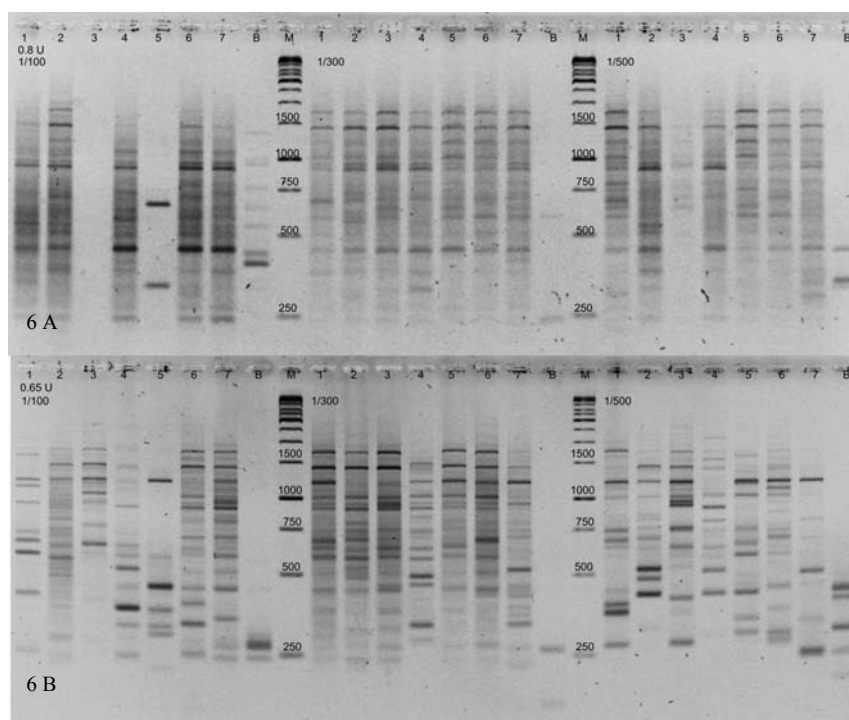


Figura 6. Puesta a punto del cebador. Los individuos escogidos al azar se numeran del 1 al 7 y la B corresponde al control negativo. En las reacciones correspondientes a la figura 6.A se cargaron 0.8 Unidades de enzima Taq polimerasa y en la figura 6.B se cargaron 0.65 Unidades, los valores de las diluciones empleadas (1/100, 1/300 y 1/500) están al pie de cada grupo de individuos. La disminución del ADN en las reacciones mejoró los perfiles independientemente de la cantidad de enzima Taq polimerasa añadida, de la misma manera para iguales cantidades de ADN añadido una menor cantidad de enzima Taq polimerasa resultó en mejores perfiles.

Diversidad y estructura

Los valores de la Diversidad Genética de Nei o heterocigosis esperada están en la primera columna de la tabla 1, para las tres poblaciones de *Baccharis crispa* de los sitios 1, 2 y 3 son: 0.17, 0.14 y 0.13 respectivamente. El mismo cálculo para las poblaciones de *B. trimera* en el mismo orden es de: 0.15, 0.14 y 0.13 respectivamente.

Tanto *B. crispa* como *B. trimera* tienen valores muy similares de diversidad genética, pero de acuerdo a este índice *B. crispa* es levemente más diversa que *B. trimera*. Para el estadístico F_{st} los resultados son para *B. crispa* un valor de 0.04 y para *B. trimera* un valor de 0.07.

Tabla 1. En la tabla se muestran los cálculos de la diversidad genética de Nei para las poblaciones individuales, los sitios y las especies. Ni las especies ni las poblaciones ni los sitios difieren demasiado en los resultados.

Población	Diversidad de Nei
1C	0.1673
1T	0.1482
2C	0.1381
2T	0.1442
3C	0.1341
3T	0.1323
Sitio1	0.1427
Sitio 2	0.1370
Sitio 3	0.1212
<i>B. crispa</i>	0.0926
<i>B.trimera</i>	0.0923

Distancias

Los valores de la Distancia de Nei entre poblaciones se muestran en la figura 7, no se ven ningún patrón general claro, pero para dos sitios (1 y 3) la distancia de Nei (“Nei’s unbiased distance” 1987) entre especies es menor que las distancias intra-específicas con los demás sitios.

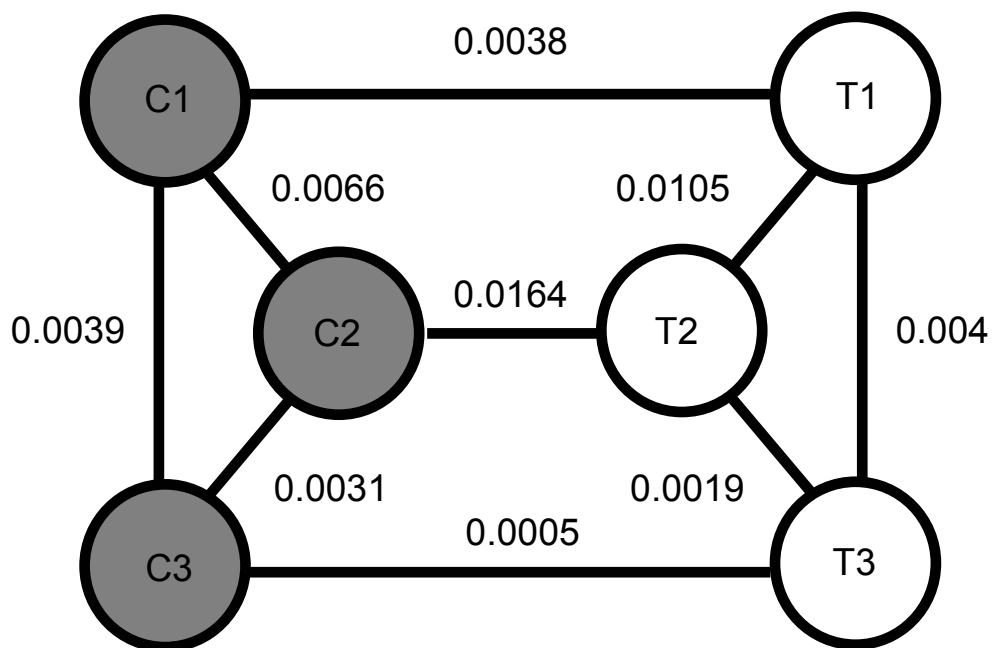


Figura 7. Distancias entre poblaciones. Cada círculo representa una población, los números indican el sitio y las letras C y T indican *Baccharis crisa* y *B. trimera* respectivamente. La distancia más pequeña encontrada se da entre poblaciones de distinta especie en el sitio 3 (0.0005), mientras que la más grande ocurre también entre poblaciones de distintas especies en el sitio 2 (0.0164)

La distancia más corta se dio entre poblaciones de 2 especies en el sitio 3, y en el sitio 1 la distancia es también muy pequeña, en contraste con esto para el sitio 2 se registró la mayor distancia, y fue entre poblaciones de distintas especies.

Coordenadas principales

El análisis de coordenadas principales basado en la matriz de similitud para cada sitio (figura 8) está representado por dos nubes de puntos; en cada caso los cuadrados representan la especie *Baccharis trimera* y los triángulos la especie *B. crispa*. Para cada análisis se muestran tres ejes, el máximo representable para una interpretación geométrica simple. La figura que se muestra corresponde al análisis hecho con la matriz de similitud de Jaccard. En el sitio 1 los tres primeros ejes (x, y, z) suman el 47,3 % de la variación total, para el sitio 2 los tres primeros ejes suman el 40,56 % de la variación y para el sitio 3 el 29,73 %. Claramente el sitio 2 se estructura en dos nubes separadas reconocibles como las dos especies, mientras que para los sitios 1 y 3 esta estructura no es tan evidente.

En el caso del sitio 2 (figura 8.B), hacia la izquierda del eje x se agrupan los individuos de *B. trimera* y hacia derecha los de *B. crispa*. El gráfico para el sitio 1 (figura 8.A) si bien no revela el tipo de estructura que vemos para el sitio 2, deja ver una zona central donde predomina *B. crispa* y por encima y por debajo del eje Y una clara predominancia de *B. trimera*. El sitio tres (figura 8.C) es el menos estructurado de todos, la gráfica muestra que los individuos están bastante mezclados, si bien hay pequeños conjuntos de individuos de igual especie agrupados.

La representación gráfica de las distancias de Nei entre poblaciones para el método de “Lynch & Milligan” de estimar las frecuencias alélicas se muestra en la figura 8.D. El eje X con el 52.43% de la variabilidad separa los tres sitios de muestreo, mientras que a lo largo del eje Y, que retiene el 25.66 % de la variabilidad respectivamente, se separan las especies.

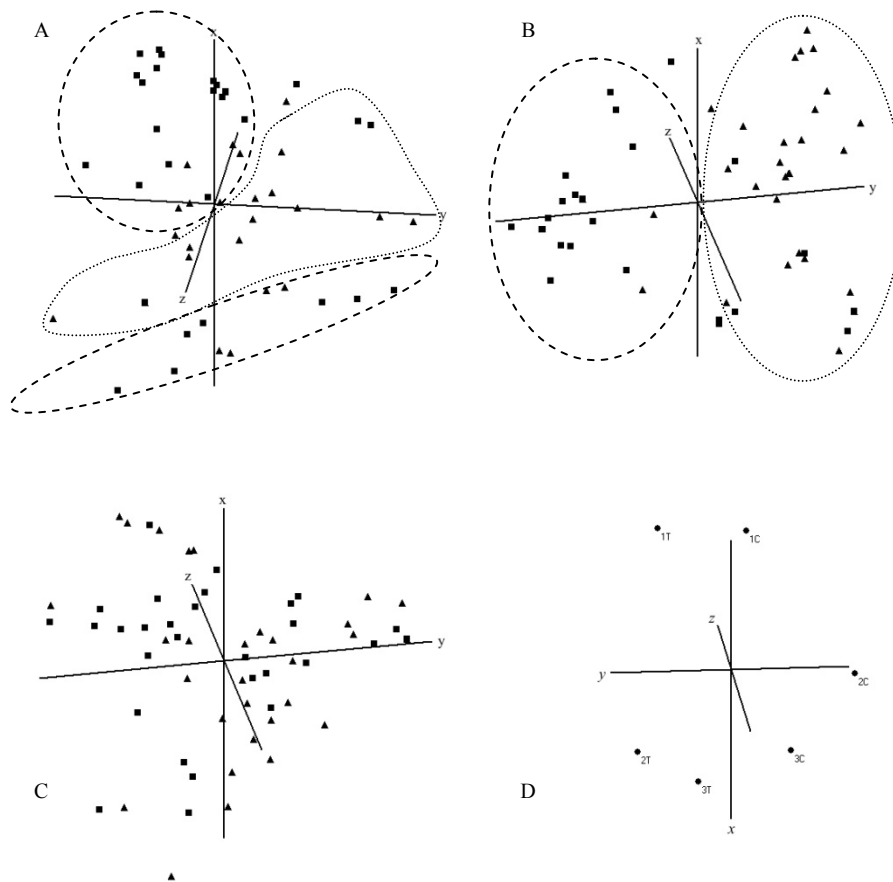


Figura 8.1 Análisis de coordenadas principales. El análisis para los tres sitios (1, 2 y 3) son las figuras 3.A, 3.B y 3.C, y para las 6 poblaciones juntas es la figura 3.D. En las figuras A-C se representan los 60 individuos de cada población, en cuadrados 30 individuos de *B. trimera* y en triángulos 30 de *B. crispera*. En las figuras se encierran los agrupamientos más notorios, dentro de las líneas de punteado grueso *B. trimera*, y dentro de la línea de punteado fino *B. crispera*.

Análisis de la Varianza

La descomposición de la varianza aporta datos concordantes con los demás resultados. Para los tres sitios la varianza intra-específica es mucho mayor que la inter-específica (figura 9), siguiendo el orden esperado el sitio 2 es el que presenta la mayor varianza inter-poblacional y el sitio 3 la menor con apenas un 1 % de varianza inter-poblacional.

La descomposición de la varianza para las especies se muestra en la figura 10, ambas especies reparten una gran proporción de su varianza genética dentro de las poblaciones, para *B. trimera* una fracción mayor de la varianza (11%) se manifiesta entre las poblaciones, al compararla con *B. crispera* (8 %).

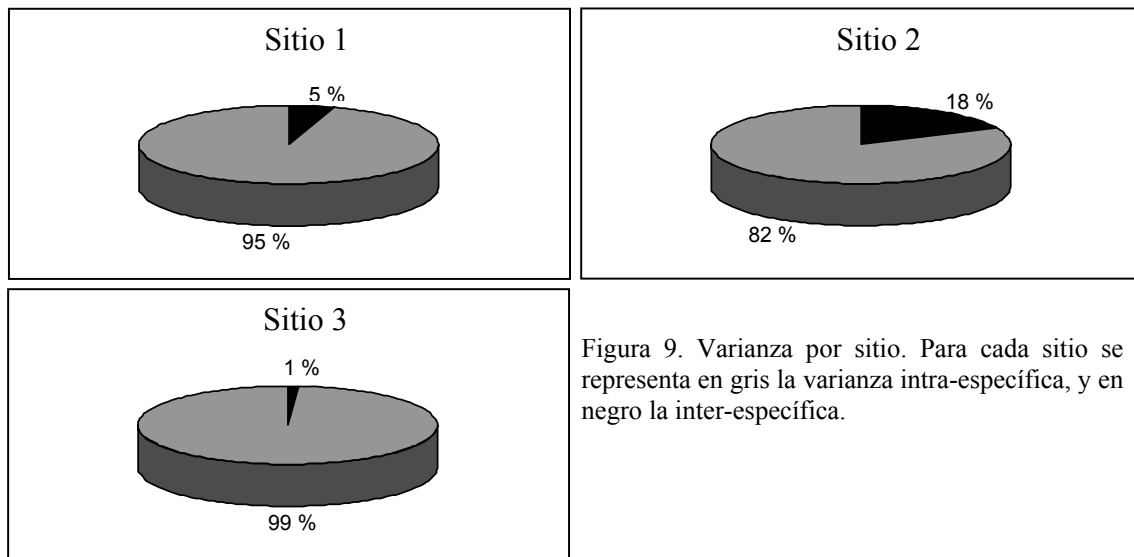


Figura 9. Varianza por sitio. Para cada sitio se representa en gris la varianza intra-específica, y en negro la inter-específica.

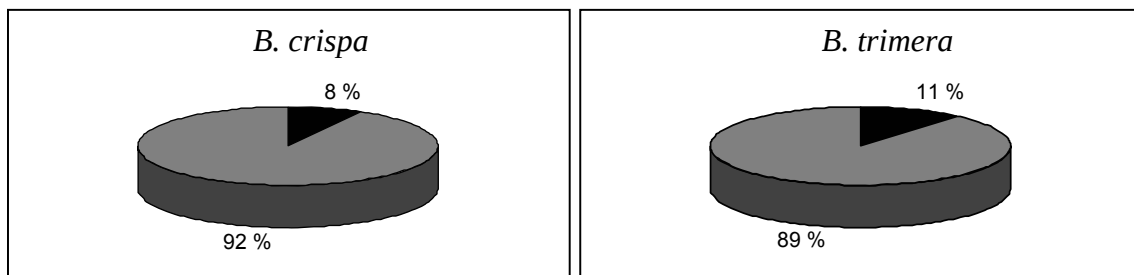


Figura 10. Varianza por especie. En gris se representa la varianza intra-poblacional, y en negro la varianza inter-poblacional. *B. trimera* presenta una mayor varianza entre sus poblaciones (11 %) en comparación con *B. crispata* (8 %).

Amplificación del Fragmento cloroplástico psbA-trnH

Como se muestra en la figura 11 la amplificación del fragmento psbA-trnH no mostró diferencias para los sitios 1 y 3, para los cuales se amplificó un único fragmento de 300 pares de bases en todos los individuos de ambas especies (indicado en la figura con la flecha pequeña). En cambio para el sitio 2 se detectó un polimorfismo de tamaño en dicho fragmento, donde una variante de 350 pares de bases (indicada en la figura con la flecha grande) aparece con una frecuencia de 0.37 en la especie *B. crispata*, mientras que todos los restantes individuos de ambas especies en este sitio comparten el mencionado fragmento de 300 pares de bases presente en los demás sitios.

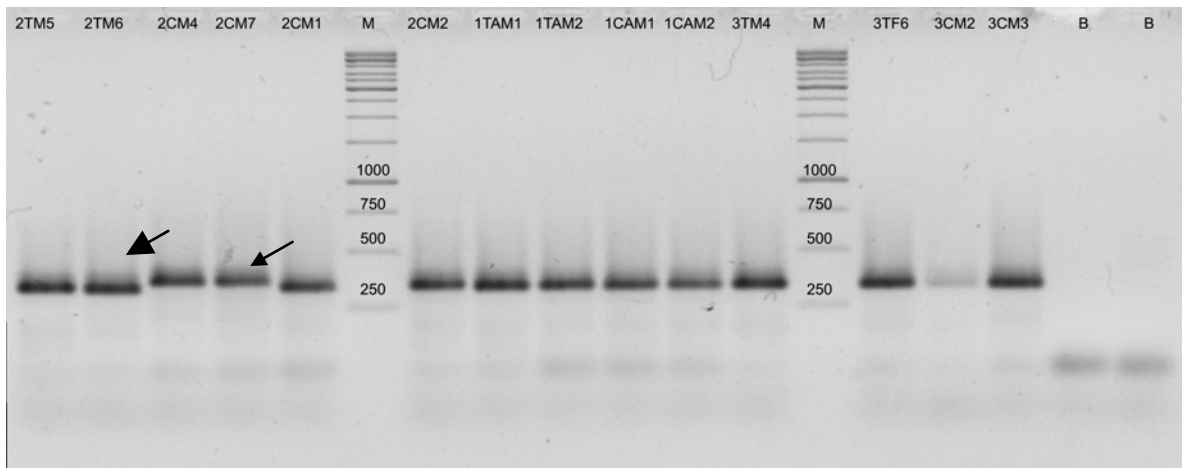


Figura 11. Amplificación del fragmento psbA-trnH. Los números que encabezan los nombres de los individuos indican el sitio (1, 2 o 3), la C o T representan *B. crisper* o *B. trimera* respectivamente, y la M o F indican Masculino o Femenino. La M sola representa el marcador de peso molecular. La flecha grande señala el fragmento de 350 pares de bases, y la flecha pequeña señala el fragmento de 300 pares de bases.

Discusión

Los valores de heterocigosis esperada resultan bajos (ver tabla 2) si se comparan con un valor referencia citado por Nybom (2004), donde se menciona un valor de 0,27 para la heterocigosis en especies alógamas con marcadores RAPD. Lo mismo sucede para el estadístico F_{st} que mide la subdivisión poblacional, en el trabajo anteriormente mencionado (Nybom 2004) el valor reportado para alógamas con marcadores dominantes (RAPD) es de 0.22, y los datos reportados de *B. crisper* y *B. trimera* son de 0.04 y 0.07 respectivamente. Esto implica que la contribución de la subdivisión poblacional a la reducción en la heterocigosis total es baja en general, pero es más baja en *B. crisper*, aun siendo ésta la más discontinua demográficamente. Algunos trabajos sugieren no ignorar el hecho de que los factores de tipo histórico o el ambiente filogenético en que se encuentran las especies sometidas a los análisis, son grandes determinantes de lo que se considera “esperado”, y que se corre un gran riesgo al comparar datos de distintos tipos de marcadores (Gitzendanner & Soltis 2000). Pero los valores muy por debajo de lo esperado para especies con este hábito reproductivo hacen que sean considerados en esta discusión, y permiten afirmar que ambas especies en las poblaciones muestreadas tienen niveles bajos de diversidad y de subdivisión poblacional. Debido a que se analizaron dos especies congéneres, y no se encontraron grandes diferencias en diversidad entre ambas, la baja diversidad y subdivisión encontradas en ambas por igual podría encontrar su origen en el elemento filogenético que relaciona a estas especies. La gran similitud en los valores de diversidad de *B. crisper* y *B. trimera* no es esperada ya que por su mayor tamaño poblacional, se esperaría que esta última sea más diversa al menos para los marcadores neutros que

se analizaron (Hartl & Clark 1989, White & Searle 2007). Los cálculos que predicen que las poblaciones más grandes mantienen más variabilidad genética asumen equilibrio (Guillespie 1998), este supuesto implica cierto conocimiento de la historia de las poblaciones, y que ambas poblaciones cumplan estos requerimientos. Por otro lado los factores históricos a los que estas poblaciones pueden haber estado sometidas más o menos recientemente, como reducciones o expansiones de tamaños poblacionales, no solo son desconocidas sino que pueden afectar de forma distinta a las dos especies ya que tienen preferencias ecológicas distintas y pueden debilitar las conclusiones sacadas de estos datos. Eventos como una expansión demográfica reciente de *B. trimera* generaría como artefacto una menor diversidad de lo esperado para el tamaño poblacional observado, de manera inversa una reciente reducción demográfica en *B. crispa* ocasionaría que esta especie pareciera más diversa de lo que su actual tamaño poblacional sugiere. También una situación de selección balanceadora puede explicar más polimorfismo de lo esperado en ciertos loci (Aguilar *et al.* 2004), pero esta variabilidad puede restringirse solo a dichos loci permitiendo que los demás sufran los efectos homogeneizadores de la deriva (Aguilar *et al.* 2004), por tanto los loci neutros deberían estar muy ligados a los loci bajo selección para ser afectados. Estos cambios demográficos podrían afectar también estadísticos como el F_{st} , por ejemplo una expansión poblacional rápida puede ocasionar que una especie con una amplia distribución presente poblaciones con frecuencias alélicas muy parecidas, y por tanto H_s y H_t sean muy similares, y el valor de F_{st} sea muy bajo.

La estrategia planteada, de detectar bandas compartidas sitio-específicas, para detectar flujo génico entre las especies *Baccharis trimera* y *B. crispa*, no arrojó resultados con el cebador utilizado (ISSR 6). Dichas bandas no fueron detectadas y tampoco se detectaron bandas que cumplan algunos de los requisitos encontrados en la literatura para ser considerados especie específicos, siendo estos requisitos frecuencias diferenciales entre ambas especies (Daheler & Strong 1997, Neufer *et al.* 1999, Lamont *et al.* 2003, Gonzalez-Rodriguez *et al.* 2004).

Considerando la versión cuantitativa de la estrategia, las distancias poblacionales, no hay un patrón claro, la distancia menor es entre poblaciones de especies distintas, para el sitio 3, y la distancia mayor es también entre poblaciones de especies distintas en el sitio 2. Esto podría deberse a una más temprana colonización del sitio 3, lo que habría dado más tiempo al flujo génico, o a una más temprana colonización del sitio 2 y un mayor tiempo de selección natural. Se esperaba que las poblaciones de *B. trimera* fueran las más cercanas entre sí, al menos por dos razones, en primer lugar *B. trimera* es la especie más ampliamente distribuida, de manera más continua y que presenta

a priori más capacidad de flujo génico entre sitios. En marcado contraste, *B. crispa* se distribuye en un ambiente mucho más restringido, limitado a afloramientos rocosos aislados, por lo que la continuidad de poblaciones (que harían factible el flujo génico) es menor. Una segunda razón para esperar que las poblaciones de *B. crispa* sean más divergentes es su pequeño tamaño, lo que las haría más propensas a la diferenciación por deriva génica (Hartl & Clark 1989). El considerar aspectos selectivos para explicar este patrón implicaría que muchos de estos marcadores estuvieran bajo selección o ligados a loci bajo selección en *B. crispa*, lo cual es poco probable, por otro lado podría reflejar simplemente diferencias de tipo histórico. Las distancias entre los sitios de colecta 1-2, 2-3 y 1-3 son de 31.5, 41.3 y 65.8 kilómetros respectivamente (ver figura 4), en algunos trabajos (Beekman & Ratnieks 2000) se menciona el valor de 10 km como la distancia máxima recorrida por especies polinizadoras como *Apis melífera*, de manera que se podría pensar que el flujo génico entre sitios es poco probable. De todos modos es claro que las distancias genéticas no muestran una tendencia importante, esto puede deberse probablemente al bajo número de marcadores usados en el estudio.

En cuanto al problema de la hibridación inter-específica, si contemplamos solo la distribución de las poblaciones, los datos reportados no se ajustan a un modelo sin flujo, la corta distancia de los sitios 1 y 3 entre las especies implica el agregado de flujo génico al modelo A. La presencia de polimorfismo cloroplástico en *B. crispa* en el sitio 2 y no en los demás es coherente con el hecho de que éste es el sitio donde los individuos tienen mayor estructura en el análisis de coordenadas principales, y presenta la mayor distancia entre poblaciones. Esto sugiere que el sitio 2 es aquel donde ocurre el menor flujo génico, y por tanto *B. crispa* aún retiene estos alelos distintos a los de *B. trimera*. Lorenze-Lemke *et al.* (2006), en un trabajo con dos especies, una muy distribuida geográficamente y una restringida a pequeñas salientes arenosas, se secuenciaron tres fragmentos cloroplásticos, encontrando 13 haplotipos, de los cuales algunos eran específicos de cada especie, y en algunas poblaciones mixtas estaban en ambas especies y en los potenciales híbridos. Esto permitió a los autores anteriormente mencionados concluir que se encontraban frente a una situación de contacto secundario. En el presente trabajo solo se detectan dos haplotipos y solo uno es propio de una especie, por lo que la idea de que éstos sean haplotipos ancestrales no se puede descartar. Si suponemos que en los demás sitios *B. crispa* mantuvo en algún momento haplotipos distintos a *B. trimera*, y que se homogeneizó a nivel cloroplástico con esta última por hibridación, pero manteniendo diferencias a nivel nuclear que expliquen la diferencia morfológica, el proceso debiera haber sido la captura de los cloroplastos de *B. trimera* por parte de *B. crispa*. Debido a que en todos los sitios visitados *B. trimera* era siempre mucho más abundante, por azar se espera que el

polen de *B. trimera* llegue a muchas plantas de *B. crispa*, y no la situación inversa, por lo tanto para que *B. crispa* capture cloroplastos de su congénere, algún fenómeno de incompatibilidad o fenológico debiera marcar la dirección del flujo. Por ejemplo, si en ambas especies florecen las plantas masculinas primero, y *B. trimera* floreciera primero, en el solapamiento de las floraciones existirían principalmente flores femeninas de *B. trimera* y flores masculinas de *B. crispa*, lo cual daría cierta preferencia al flujo de polen de *B. crispa* hacia *B. trimera*. Evidentemente si florecieran las plantas femeninas primero el orden de floración debería ser el opuesto.

Para completar la interpretación de la variación genética intra e inter-específica en estas especies es necesario conocer con mayor profundidad aspectos fenológicos y ecológicos. Adicionalmente, este estudio también se beneficiaría de un muestreo a mayor escala geográfica, secuenciar fragmentos cloroplásticos, usar más marcadores ISSR u otras secuencias nucleares. Esto permitiría probar varias hipótesis evolutivas, como por ejemplo si estas poblaciones son apenas parte de una gran zona híbrida, si sus rasgos comunes son producto de la distribución de linajes, o si estas poblaciones están atravesando cambios demográficos. Finalmente la importancia agronómica potencial de estas especies hace que este conocimiento tenga como fin inmediato el desarrollo de tecnología y la elaboración de planes de manejo para la conservación y prospección de germoplasma.

Conclusiones

La importancia medicinal de las “carquejas”, su potencial agronómico y la dificultad existente en la sección Caulopterae DC para resolver diferencias entre especies la hacen un grupo interesante de abordar. Este es el primer estudio con marcadores moleculares de poblaciones Uruguayas de *Baccharis crispa* y *B. trimera*. Ambas especies presentaron en las poblaciones analizadas valores bajos y similares de diversidad genética. Esto podría explicarse por fenómenos demográficos recientes y la cercanía filogenética entre ambas especies. No se encontraron marcadores especie específicos, pero el análisis de coordenadas principales y las distancias genéticas entre poblaciones sugieren que al menos en el sitio 2 (Salto del penitente) hay dos grupos distintos que se corresponden con *Baccharis crispa* y *B. trimera*. La presencia del haplotipo cloroplástico único de *B. crispa* en el sitio 2 corrobora lo anterior. Estos resultados preliminares muestran que además de la diferenciación morfológica entre estas dos especies, observada durante la colección del material biológico, podría existir un cierto grado de diferenciación genética. Para determinar con mayor precisión el grado de aislamiento reproductivo entre estas dos especies y diseñar herramientas para implementar un sistema de trazabilidad de sus productos derivados sería necesario ampliar el

muestreo y el número de marcadores, ésto permitiría determinar la direccionalidad del flujo génico entre las especies.

Referencias

- Abad M J, A L Besa, B Ballarin. 2006. Anti-inflammatory activity of four Bolivian baccharis species compositae. *Journal of Ethnopharmacology* 103 (20) 338-344.
- Aguilar A, G Roemer, S Debenham. 2004. High mhc diversity maintained by balancing selection in an otherwise genetically monomorphic mammal. 10 (10) 3490-3494.
- Abrahams M D, B D Kloeppel, M E Kubiske. 1992. Ecophysiological and morphological responses to shade and drought in two contrasting ecotypes of *Prunus serotina*. *Tree Physiology* 10 (4) 343-355.
- Aldrich J, B W Cherney, E Merlin. 1988. The role of insertions/deletions in the evolution of the intergenic region between psbA and trnH in the chloroplast genome. *Current Genetics* 14 (2) 137-146.
- Arredondo M F, F Blasina, C Echeverry, A Morquio, M Ferreira, J A Abin-Carriquiry, L Lafon, F Dajas. 2004. Cytoprotection by *Achyrocline satureioides* (Lam) D.C. and some of its main flavonoids against oxidative stress. *Journal of Ethnopharmacology* 91 (1) 13-20.
- Barroso G M. 1976. Compositae Subtribo Baccharidinae Hoffmann Estudo das espécies ocorrentes no Brasil. *Rodriguésia* 28 (40) 1-273.
- Barton, H N. 2001. The role of Hybridization in evolution. *Molecular ecology* 10 () 551-568.
- Beekman M, F L Ratnieks. 2000. Long-range foraging by the honey-bee, *Apis mellifera*. *Functional Ecology* 14 (4) 490-496.
- Beurton P. 2002. Ernst Mayr through time on the biological species concept: a conceptual analysis. *Theory in Biosciences* 121 (2) 81-98.
- Bonin A, E Erich, S Manel. 2007a. Statistical analysis of amplified fragment length polymorphism data: a toolbox for molecular ecologists and evolutionists.. *Molecular Ecology* 16 (18) 3737-3758.
- Bonin, A, F Nicole, F Pompanon, C Miaud, P Taberlet. 2007b. Population adaptive index: a new method to help measure intraspecific genetic diversity and prioritize populations for conservation. *Conservation Biology* 21 (3) 697-708.

- Bornet B, M Branchard. 2001. Nonanchored inter simple sequence repeat (ISSR) markers: reproducible and specific tools for genome fingerprinting. *Plant Molecular Biology* 19 (3) 209-215.
- Budel, J M, M R Duarte, C A M Santos, L M Cunha. 2003. Macro and microscopical identification of four species of *Baccharis* from trimera group. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 14 (2) 42-43.
- Bugess K S, M Morgan, L Deverno, B C Husband. 2005. Asymmetrical introgression between two *Morus* species (*M.alba*, *M .rubra*) that differ in abundance. *Molecular Ecology* 14 (11) 3471-3483.
- Cortadi A, O Di sapio, J Mc cargo, A Scandizzi, S Gattuso, M Gatusso. 1999. Anatomical Studies Of *Baccharis articulata* *Baccharis crispa* And *Baccharis trimera* "carquejas" Used In Folk Medicine. *Pharmaceutical Biology* 3 (5) 357-365.
- Daheler C C, D R Strong. 1997. Hybridization between introduced smooth cordgrass (*Spartina alterniflora*, Poaceae) and native california cordgrass (*S. foliosa*) in San Francisco Bay, California, USA. *American Journal of Botany* 84 (5) 607-611
- de Queiroz K. 2005. Ernst Mayr and the modern concept of species. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102 (1) 6600-6607.
- Dong F, J M McGrath, J P Helgeson. 2001. The genetic identity of alien chromosomes in potato breeding lines revealed by sequential GISH and FISH analyses using chromosome-specific cytogenetic DNA markers. *Genome* 44 (4) 729-734.
- Doyle J J, E. E. Dickson. 1987. Preservation of plant samples for ADN restriction endonuclease analysis. *Taxon* 36(4) 715-722.
- Ducarme V, R A Wesselingh. 2005. Detecting hybridization in mixed populations of *Rhinanthus minor* and *Rhinanthus angustifolius*. *Folia Geobotanica Phytotaxonomica* 40 (2-3) 151-161.
- Durrett R, L Buttel, R Harrison. 2000. Spatial models for hybrid zones. *Heredity* 84 (1) 9-19.
- Elstrand NC, R Wihtkus, L Riesberg. 1996. Distribution of spontaneous plant hybrids. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93 (10) 5090-5093.
- Excofier, L, G Heckel,. 2006. Computer programs for population genetics data analysis: a survival guide *Nature Reviews Genetics* 7 745-758

- Excoffier L, P E Smouse, JM Quattro. 1992. Analysis of Molecular Variance Inferred From Metric Distances Among ADN Haplotypes: Application to Human Mitochondrial ADN restriction Data. *Genetics* 131 (2) 479-791.
- Friesen N, R Fritsch, K Bachman. 1997. Hybrid origin of some ornamentals of *Allium* subgenus *melanocrommyum* verified with GISH and RAPD. *Theoretical and Applied Genetics* 95 (8) 1229-1238
- Fritz RS, CM Nichols-Orians, SJ Brunsfeld. 1994. Interspecific hybridization of plants and resistance to herbivores: hypotheses, genetics, and variable responses in a diverse herbivore community. *Oecologia* 97 (5) 106-117
- Fritz R S. 1999. Resistance of hybrid plants to herbivores: genes environment or both. *Ecology* 80 (2) 382-391
- FUNDAQUIM, RED PROPYMES, URU. TEC, FUNDASOL, COOPERACIÓN TÉCNICA ALEMANA (GTZ) 2005. Aportes para el desarrollo del sector de plantas medicinales y aromáticas del Uruguay (Capítulo III.2 página 30)
- Futuyma D. 1998. *Evolutionary Biology*. Third Edition. Sinauer Associates, Chapter 15.
- Gibbs A J, M J Gibbs. 2006. A broader definition of 'the virus species'. *Archives of Virology* 151 (7) 1419-1422
- Gillespie J H. 1998. *Population Genetics: a concise guide*. The Johns Hopkins University Press. Chapter 2.
- Gitzendanner M, P Soltis. 2000. Patterns of genetic variation in rare and widespread plant congeners. *American Journal of Botany* 87 (6) 783-792.
- Giuliano, D A. 2001. Clasificación infragenérica de las especies argentinas de *Baccharis*, *Asteraceae*, *Astereae*. *Darwiniana* 39 (1-2) 131-154.
- González-Forero, M. 2009. Removing ambiguity from the biological species concept. *Journal of Theoretical Biology* 256 (1) 76-80.
- Gonzalez-Rodriguez A, D M Arias, S Valencia. 2004. Morphological and RAPDs analysis of hybridization between *Quercus affinis* and *Q. laurina* (Fagaceae), two mexican red oaks. *American Journal of Botany* 91 (3) 401-409.
- Gower J C. 1971. A general coefficient of similarity and some of its properties. *Biometrics* 27 (4) 857-871.
- Grant V. 1989. *Especiación vegetal*. Editorial Limusa.
- Hagemann R. 2000. Erwin Baur or Carl Correns who really created the theory of plastid inheritance. *The American Genetic Association* 61 (6) 434-450.

- Hamrick J L, Y B Linhart, J B Mitton. 1979. Relationships between life history characteristics and electrophoretically detectable genetic variation in plants. *Annual Reviews of Ecology and Systematics* 10 () 173-200.
- Hartl D L, A G Clark. 1989. *Principles of Population Genetics*. Second Edition. Sinauer Associates. Capitulo 2.
- Harvey C F, G P Gill, L G Fraser. 1997. Sex determination in actinidia. 1. Sex-linked markers and progeny sex ratio in diploid a. *Chinensis*. *Sexual Plant Reproduction* 10 (3) 147-154.
- Hegarty M J, S J Hiscok. 2004. Hybrid speciation in plants: new insights from molecular studies. *New Phytologist* 165 (2) 411-423.
- Hollingsworth, P M, R A Ennos. 2004. Neighbour joining trees, dominant markers and population genetic structure. *Heredity* 92 490-498.
- Hufford K M, S J Mazer. 2003. Plant ecotypes: genetic differentiation in the age of ecological restoration. *Trends in Ecology and Evolution* 18 (3) 147-155.
- Iovene M, S Savarese, T Cardi. 2007. Nuclear and cytoplasmic genome composition of *Solanum bulbocastanum* x *Solanum tuberosum* somatic hybrids. *Genome* 50 (5) 443-450.
- Januário A H, S L Santos, S Marcussi, V M Mazzi, R C Pietro, D N Sato, J Ellene, S V Sampaio, S C Franca, A M Soares. 2004. Neo clerodane diterpenoid, a new metalloprotease snake venom inhibitor from *Baccharis trimera*, Asteraceae anti proteolytic and anti hemorrhagic properties. *Chemico Biological Interactions* 150 (3) 243-251.
- Judd S W, S C Campbell, E A Kellogg, P F Stevens, M J Donoghue. 2002. *Plant Systematics a phylogenetic approach*. Chapter 9, pp 480. Second Edition. Sinauer Associates Inc, Sunderland Massachusetts U.S.A
- Kampfer P, R Rosselló-Mora. 2004. The species concept for prokaryotic microorganism an obstacle for describing diversity?. *Poiesis & Praxis* 3 (1-2) 62-72.
- Kreitman M, M Aguadé. 1986. Excess polymorphism at the *adh* locus in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 114 (1) 93-110.
- Kosman E, J Leonard. 2005. Similarity coefficients for molecular markers in studies of genetic relationships between individuals for haploid, diploid, and polyploid species. *Molecular Ecology* 14 (2) 415-424.

- Lago J H, P Romoff, O A Favero, F O Souza, M G Soares, P T Baraldi, AG Correa. 2008. Chemical composition of male and female *Baccharis trimera* Less DC Asteraceae essential oils. *Biochemical Systematics and Ecology* 36 (9) 737-740.
- Lamont B B, T He, N J Enrigh. 2003. Anthropogenic disturbance promotes hybridization between banksia species by altering their biology. *Journal of Evolutionary Biology*. 16 (4) 551-557.
- Litt M, J A Luty. 1989. A hypervariable microsatellite revealed by in-vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *American Journal of Human Genetics* 44 (3) 397-401.
- Lombardo A. 1983. Flora Montevidensis. Intendencia Municipal de Montevideo paginas 202-207.
- Lorenze-Lemke A, G Mader, V C Muschner. 2006. Diversity and natural hybridization in a highly endemic species of *Petunia* (Solanaceae): a molecular and ecological analysis, *Molecular Ecology* 15 (14) 4487-4497
- Lu G, Bernatchez L. 1998. Experimental evidence for reduced hybrid viability between dwarf and normal ecotypes of Lake Whitefish (*Coregonus clupeaformis* Mitchill). *Proceedings of the Royal Society of London* 253 (1400) 1025-1030.
- Mangiaterra A. 2005. Evaluación de parámetros botánicos y fitoquímicos para el control de calidad de carqueja. Tesis de Licenciatura en Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad deBelgrano.
- Mulcahy D L, N F Weeden, R Kesseli, S B Carroll. 1992. DNA probes for the Y-chromosome of *Silene latifolia*, a dioecious angiosperm. *Sexual Plant Reproduction* 5 (1) 86-88
- Nei M. 1973. Analysis of Gene Diversity in Subdivided Populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 70 (12) 3321-3323.
- Nei M. 1977. F statistics and analysis of gene diversity in subdivided populations. *Annals of Human Genetics* 41 225-233.
- Nei M, W H Li. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 5269-5273.
- Nei M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press cap 9.
- Neigel J E. 2002. Is F_{st} obsolete?. *Conservation Genetics* 3 (2) 167-173.
- Neuffer B, H Auge, H Mesch. 1999. Spread of violets in polluted pine forests morfphological and molecular evidence for the ecological importance of interspecific hybridization. *Molecular Ecology* 8 (3) 365-377.

- Nordborg M, J Bergelson. 1999. The effect of seed and rosette cold treatment on germination and flowering time in some *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae) ecotypes. *American Journal of Botany* 86 (4) 470-475
- Nosil P, L J Harmon, O Seehausen. 2008. Ecological explanations for (incomplete) speciation. *Trends in Ecology and Evolution* 24 (3) 145-155
- Nybom H. 2004. Comparison of different nuclear ADN markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. *Molecular Ecology* 13 (5) 1143-1155.
- Oliveira A C, E C Endringer, L A Amorim, M Brandao, M M Cohelo. 2005. Effect of the extracts and fractions of *Baccharis trimera* and *Byzygium cumini* on glycaemia of diabetic and non-diabetic mice. *Journal of Ethnopharmacology* 102 (3) 465-469.
- Osbaldeston T. A. 2000. *Dioscorides: De materia medica*, Johannesburg, IBIDIS Press.
- Paz A E, M J Bassagoda, F Ferreira. 1992. *Uso racional de las plantas medicinales*. Editorial Fin de siglo. Montevideo Uruguay.
- Panova M, J Hollander, K Johannesson. 2006. Site-specific genetic divergence in parallel hybrid zones suggests non allopatric evolution of reproductive barriers. *Molecular Ecology* 15 (13) 4021-4031.
- Paul E L, A Lunardelli, E Caberlon. 2009. Anti-inflammatory and immunomodulatory effects of *baccharis trimera* aqueous extract on induced pleurisy in rats and lymphoproliferation in vitro. *Inflammation* 36 (6) 419-425.
- Penner, G A, A Bush, R Wise, W Kim, L Domier, K Kasha, A Larroche, G Scoles, S J Molnar, G Fedak. 1993. Reproducibility of random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis among laboratories. *Genome Research* 2 (4) 341-345.
- Rentaría M. 2007. *Ecología Molecular*. Secretaría de medio ambiente y recursos naturales, Instituto Nacional de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México, Comisión Nacional para el conocimiento y uso de la Biodiversidad. Capítulo 18 (Breve revisión de los marcadores moleculares) paginas 541-562.
- Riesberg L H, D Gerber. 1994. Hybridization in the Catalina island mountain mahogany (*Cercocarpus traskiae*): rapid evidence. *Conservation Biology* 9 (1) 199-203.
- Riesberg L H, D E Soltis. 1991. Phylogenetic consequences of cytoplasmic gene flow in plants. *Evolutionary Trends in Plants* 5 (1) 65-84.
- Riesberg L H, N C Ellstrand. 1993. What can molecular and morphological markers tell us about plant hybridization. *Critical Reviews in Plant Sciences* 12 (3) 213-241

- Riesberg L H, S E Carney. 1998. Plant hybridization. *New Phytologist* 140 (4) 599-624.
- Rodrigues C R, J H Dias, D R deMello, M F Richter, J N Picada, A B Ferraz. 2009. Genotoxic and antigenotoxic properties of *Baccharis trimera* in mice. *Journal of Ethnopharmacology* 125 (1) 97-101.
- Rodriguez M V, Gattuso S, Gattuso M. 2007. *Baccharis crispa* y *Baccharis trimera* (Asteraceae): Revisión y Nuevos Aportes para su Normalización Micrográfica. *Latin American Journal of Pharmacy* 27 (3) 387-397.
- Sanda J L, R M Amasino. 1996. Ecotype-Specific Expression of a Flowering Mutant Phenotype in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* 11 (2) 641-644.
- Sang T, D J Crawford, T F Stuessy. 1997. Chloroplast ADN phylogeny, reticulate evolution, and biogeography of *Paeonia* (Paeoniaceae). *American Journal of Botany* 84 (8) 1120-1136.
- Sanger F, A R Coulson. 1974. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *Journal of Molecular Biology* 94 441-448.
- Schlüter P M, Harris, S A. 2006. Analysis of multilocus fingerprinting data sets containing missing data, *Mol. Ecol. Notes*: 6: 569-572.
- Shaw Joey, E B Lickey, J T Beck, S B Farmer, W Liu, J Miller, K C Siripun, C T Winder, E E Schilling, R L Small. 2005. The tortoise and the hare ii: relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences. *American Journal of Botany* 92 (1) 144-166.
- Shinozaki K, M Ohme, M Tanaka, T Wakasugi, N Hayashida, T Matsubayashi, N Zaita, J Chunwongse, J Obokata, KY Shinozaki, C Ohto, K Torazawa, Meng BY, M Sugita, H Deno, T Kamogashira, K Yamada, J Kusuda, F Takaiwa, A Kato, N Tohdoh, H Shimada, M Sugiura. 1986. The complete nucleotide sequence of the tobacco chloroplast genome: its gene organization and expression. *EMBO J* 5:2043-2049
- Silva F G, C B Oliveira, J E Pinto, V E Nascimento, S C Santos, J C Seraphind, P H Ferri. 2007. Seasonal Variability in the Essential Oils of Wild and Cultivated *Baccharis trimera*. *Sociedade Brasileira de Química* 18 (5) 990-997.
- Simoes-Pires C A, S Debenedetti, E Spegazzini, L A Mentz, N IMatzenbacher, R P Limberger, A T Henriques. 2005. Investigation of the essential oil from eight

- species of *Baccharis* belonging to sect *Caulopterae* (Asteraceae; Astereae) a taxonomic approach. *Plant Systematics and Evolution* 253 (1-4) 23-32.
- Sunnucks P. 2000. Efficient genetic markers for population biology. *Trends in Ecology and Evolution*. 15 (5) 199-203.
- Speranza P R, G J Seijo, I A Grela. 2007. Chloroplast DNA variation in the *Turnera sidoides* L. Complex (Turneraceae): biogeographical implications. *Journal of Biogeography* 34 (3) 427-436.
- Sugiura M. 1992. The chloroplast genome. *Plant Molecular Biology*. 19 (1) 149-168.
- Taberlet P, L Gielly, G Pautou. 1991. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology* 17 (5) 1105-1109.
- Tian D, H Araki, E Stahl. 2002. Signature of balancing selection in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99 (17) 11525-11530.
- Vos P, R Hogers, M Bleeker, M Reijmans, T Van De Le, M Hornes, A Frijters, J Pot, J Peleman, M Kuiper, M Zabeau. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 23 (21) 4407-4414.
- Weir B S, Cockerham C. 1984. Estimating F-Statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38 (6) 1358-1370.
- Weir B S. 1996. *Genetic Data Analysis II Second Edition*. Sinauer Associates. Capitulo 6 paginas 281-283.
- Welsch W, M McClelland. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research* 18 (20) 7213-7318.
- White T, J B Searle. 2007. Genetic diversity and population size: island populations of the common shrew, *Sorex araneus*. *Molecular Ecology* 16 (10) 2005-2016.
- WHO. 2008. Fact sheet N°134, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs134/en/>
- Williams J G, A Kubelic, K Livak, J Rafalsky, S Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18 (22) 6531-6535.
- Wolfe A D, Q Xiang, S R Kephart. 1998. Assessing hybridization in natural populations of *Penstemon scrophulariaceae* using hypervariable intersimple sequence repeat issr bands. *Molecular Ecology* 7 (x) 1107-1125.
- Xia X. 2002. *Data analysis in molecular biology and evolution*. Kluwer Academic Publishers. Second edition. Capitulo 18 pagina 179.

- Yeh F C, R C Yang, T Boyle, Z H Ye, J Mao. 1997. Popgene, the user-friendly shareware for population genetic analysis. Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta, Canada . (<http://www.ualberta.ca/~fyeh/fyeh>).
- Zietkiewicz E, A Rafalsky, D Labuda. 1994. Genome fingerprinting by Simple Sequence Repeat (SSR)-Anchored Polymerase Chain Reaction Amplification. Genomics 20 (2) 176-183.
- Zuloaga F O, Morrone O, Belgrano M (eds).2008.Catálogo de las Plantas Vasculares del Cono Sur. Missouri Botanical Garden Saint Louis, Missouri. U.S.A, páginas. 1177-1207.