



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE HÍBRIDOS COMERCIALES  
Y ESPECIES DE UN BANCO DE GERMOPLASMA DE  
*GYPSOPHILA* MEDIANTE AFLP

Autora

Carolina Cumandá Santillán Proaño

2017



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

***CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE HÍBRIDOS COMERCIALES Y  
ESPECIES DE UN BANCO DE GERMOPLASMA DE GYPSOPHILA  
MEDIANTE AFLP***

Trabajo de Titulación presentado en la conformidad con los requisitos  
establecidos para optar por el título de Ingeniera en Biotecnología

Profesor guía

Msc. Fernando Xavier Rivas Romero

Autor

Carolina Cumandá Santillán Proaño

Año

2017

## **DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA**

“Declaro haber dirigido este trabajo a través de reuniones periódicas con el estudiante, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación”.

---

Fernando Xavier Rivas Romero  
Máster en Biotecnología Molecular y Celular de Plantas  
CC: 1718092701

## **DECLARACIÓN DEL PROFESOR CORRECTOR**

“Declaro haber revisado este trabajo, dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación”.

---

Fabio Marcelo Idrovo Espín

Doctor en Ciencias Biológicas: Biotecnología  
CC: 1705952255

## **DECLARACIÓN DEL DIRECTOR CIENTÍFICO**

“Declaro haber dirigido científicamente al estudiante para la realización de su trabajo experimental de titulación en base al método científico, conduciéndole con coherencia en el conjunto de experimentos realizados, y orientando sus conocimientos para lograr los objetivos propuestos”.

---

Diandra María Jurado Fernández  
Máster en Biotecnología de Plantas  
CC: 1711940436

## **DECLARACIÓN DEL ESTUDIANTE**

“Declaro que este trabajo es original, de mi autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes”.

---

Carolina Cumandá Santillán Proaño

CC: 1722598883

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a Dios y a mi familia por el apoyo y cariño incondicional que me han brindado a lo largo de vida universitaria, especialmente a mis padres, Cumandá y Leonardo, que con su sacrificio y guía me ayudaron a cumplir este sueño.

Gracias a mis amigos, en especial a Anita, Victoria, Jenny, Vanessa, Leticia y Felipe. Y a todos mis compañeros de universidad por regalarme tantos momentos inolvidables.

Gracias a mis amigos y compañeros de Esmeralda Breeding por brindarme su ayuda durante la realización de este proyecto. Gracias a Rosalia, Diandra, Johanna, Santiago, Jaime, y en especial a Jennifer por sus enseñanzas y consejos que me permitieron finalizar con éxito este trabajo.

## **DEDICATORIA**

A Zoilita, quien me vio  
crecer y me educo con  
su amor infinito.

Gracias mamita por los  
valores inculcados, por  
los consejos y  
paciencia.

Gracias por ser mi más  
grande tesoro.

## RESUMEN

Ecuador es uno de los países exportadores de *Gypsophila sp.* más importantes a nivel mundial. Por ello, este género se ha convertido en la segunda flor de corte de mayor exportación a nivel nacional. Sin embargo, a pesar de su gran valor comercial, en el país, no existen estudios de caracterización en ningún banco de germoplasma de este cultivo. Es por esto que la empresa privada Esmeralda Breeding & Biotechnology ha invertido en este proyecto de caracterización de híbridos comerciales y especies de *Gypsophila* a partir de la detección de polimorfismos de longitud de fragmentos amplificados (AFLP). El objetivo de este estudio fue conocer la diversidad genética existente entre 4 especies y 11 híbridos comerciales de *Gypsophila* pertenecientes al banco de germoplasma de esta empresa. Se utilizó 6 combinaciones de cebadores los cuales produjeron 295 fragmentos; de los que 173 fueron considerados polimórficos. Estos productos fueron visualizados en electroferogramas con su respectiva matriz binaria los cuales fueron generados por el software de análisis GeneMarker 2.7.0. Obteniendo un porcentaje de polimorfismo en un rango entre 46.15% a 70% para sus diferentes combinaciones. A continuación, se realizó el análisis de esta matriz mediante el software de análisis de disimilitud *DARwin 6*, el cual se generó los valores de distancia genética entre los 15 individuos, basado en el coeficiente de *Jaccard*. Los resultados se vieron respaldados con el análisis de componentes principales (ACP), que permitió la visualización de la disposición de los de los individuos. Como resultado, los marcadores AFLP permitieron separar lo distinguir a todos los genotipos estudiados. Estos datos obtenidos permitieron agrupar los híbridos comerciales en diferentes subgrupos y a la vez determinar la relación que con las especies del grupo de estudio.

**Palabras clave:** Caracterización, Marcadores moleculares, AFLP, *Gypsophila*.

## ABSTRACT

Ecuador is one of the most important exporters of *Gypsophila sp.* worldwide. For this reason, this genus has become the second greater export cut flower. However, despite the great commercial value, in Ecuador, there are no molecular characterization studies in any germplasm bank of this crop. This is why the private company Esmeralda Breeding & Biotechnology has invested in a characterization project based on the detection of amplified fragment length polymorphisms (AFLP). The aim of this study was to analyze the genetic diversity existing between 4 species and 11 commercial hybrids of *Gypsophila sp.* of the germplasm bank of this company. Six primers combinations were used for the analysis, which yielded, total 295 fragments; were 173 fragments considered polymorphic. These products were visualized on electropherograms with their respective binary matrix, which were generated by GeneMarker 2.7.0 analysis software. Obtaining a percentage of polymorphism in a range between 46.15% to 70% for their different combinations. Then, the analysis of these matrices was performed using the *DARwin 6* dissimilarity analysis software, which generated the genetic distance values among the 15 genotypes, based on the *Jaccard* coefficient. These results were supported with the principal component analysis (PCA), which allowed the visualization of the disposition of those of the individuals. As a result, the AFLP markers allowed to distinguish all the genotypes studied. These data allowed grouping the commercial hybrids in different subgroups and at the same time to determine the relation with the species of the study group.

**Key words:** Characterization, molecular markers, AFLP, *Gypsophila*.

# ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1 Antecedentes .....	1
1.2 Planteamiento del problema .....	3
1.3 Justificación .....	4
1.4 Objetivos .....	6
1.4.1 Objetivo general .....	6
1.4.2 Objetivos específicos.....	6
2. MARCO TEÓRICO.....	6
2.1 Género <i>Gypsophila</i> .....	6
2.2 Importancia en Ecuador y el mundo .....	7
2.3 Clasificación y descripción botánica .....	8
2.4 Métodos de caracterización molecular .....	11
2.4.3 AFLPs.....	11
3. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	13
3.1 Diagrama de flujo.....	14
4. PROCEDIMIENTOS .....	14
4.1 Determinación de la población y muestra.....	15
4.2 Recolección de material vegetal.....	16
4.3 Extracción de ADN y cuantificación .....	16
4.4 Digestión y ligación de adaptadores .....	17
4.5 Pre-amplificación .....	18
4.6 Amplificación selectiva.....	18
4.7 Análisis de fragmentos y procesamiento de datos .....	20
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	20
5.1 Extracción de ADN.....	20

5.2 Pre-amplificación. ....	23
5.3 Amplificación selectiva.....	24
5.4 Análisis de fragmentos y procesamiento de datos .....	25
5.4.1 <i>GeneMarker 2.7.0</i> .....	26
5.4.2 <i>DARwin 6</i> .....	29
<b>6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....</b>	<b>36</b>
6.1 Conclusiones .....	36
6.2 Recomendaciones.....	37
<b>7. REFERENCIAS .....</b>	<b>38</b>

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 Antecedentes

*Gypsophila* es un género de importancia ornamental perteneciente a la familia de las *Caryophyllaceae*. Su nombre científico proviene del griego *gypsos*, que significa yeso y *philo* que significa afinidad, lo que da a conocer el gusto de las plantas de este género por los suelos secos y calcáreos. A las plantas de este género se las conocen comúnmente como “aliento de bebe”, “velo de novia” o “nube”. Algunas de estas especies son utilizadas como flores de corte y para siembra en maceta o jardín (Pringle, 2017). Ecuador es el mayor productor de este cultivo abarcando el 77% del mercado a nivel mundial. En el Ecuador, *Gypsophila sp.* es la segunda flor de mayor exportación, después de la rosa. Gracias al posicionamiento geográfico del país, la carencia de 4 estaciones y el número de horas luz constante durante el día, se permite que la producción de *Gypsophila sp.* pueda realizarse durante todo el año sin interrupción. (ProEcuador, 2016).

Este género abarca plantas con ciclo anual (1 año), bienal (2 años) y perenne (mayor a 2 años), algunas de las cuales tienen gran importancia económica, principalmente en la producción comercial como flores de corte. De manera particular, la especie más vendida como flor de corte en el mundo es *G. paniculata* L., una especie perenne que posee buenas características de estructura, y por lo que es considerada como el genotipo base para el mejoramiento genético y la obtención de nuevas variedades de interés comercial (Moyal Ben Zvi et al., 2008). Sin embargo, las flores de *G. paniculata* L., y en general las de la mayoría de especies comerciales, presentan esterilidad masculina, lo que limita la obtención de nuevas variedades en un programa de mejoramiento. Es por esto, que se han empleado cruces con especies silvestres como método de mejoramiento convencional que la obtención de nuevos individuos. (Rady, 2006)

Muchas veces, en los programas de cruces, el origen de uno o ambos progenitores es desconocido. La estimación del distanciamiento genético entre especies y otros cultivares, es importante para conocer el nivel de relación entre estos individuos. Esta caracterización es la base para preservar e incrementar la diversidad genética entre los individuos, principalmente en el banco de germoplasma. En el proceso de estructuración de un banco de germoplasma destinado a la mejora genética, se toma en cuenta tres pasos: la creación y adición de poblaciones con variación genética útil, la identificación de individuos con fenotipos superiores y el desarrollo a partir de estos individuos seleccionados previamente. Como resultado de este mejoramiento, se espera la creación nuevas variedades de plantas con características interesantes. Es por ello que se considera muy importante la implementación de métodos de caracterización de este acervo genético. (FAO, 2014)

En general, uno de los métodos más utilizados para la caracterización de bancos de germoplasma de plantas ornamentales, ha sido el análisis de las características fenotípicas. Este método consiste en la observación de los parámetros morfológicos y filogenéticos de cada individuo. Con el pasar de los años, gracias al avance de la biotecnología, se han desarrollado técnicas de marcaje molecular, que representan una ventaja para cultivos ornamentales, ya sea en estudios de caracterización de poblaciones, diversidad genética, mejoramiento de cultivos y estudios filogenéticos (Socias i Company, Rubio Cabetas, Garcés Claver, Mallor, & Alvarez, 2014). Entre las técnicas moleculares desarrolladas, aquellas que analizan los polimorfismos del ADN, han demostrado ser los métodos más poderosos para estudios de genética de poblaciones y caracterización de germoplasma (Barcaccia, 2009). En el caso particular de *Gypsophila sp.*, son muy pocos los estudios con marcadores moleculares que han sido reportados, especialmente para determinación de diversidad genética. Se conoce que en este cultivo se han empleado *Random amplification of polymorphic DNA* (RAPDs) y microsatélites *Inter Simple Sequence Repeat* (ISSR) con el fin de determinar la diversidad genética entre especies silvestres de este género (Kosrkmaz, 2015). En otro estudio se han analizado las distancias

genéticas de un número reducido de especies silvestres e híbridos comerciales por medio la comparación de las técnicas de AFLPs (*Amplified fragment length polymorphism*), TRAPs (*Target region amplification polymorphism*), microsatélites ISSR (*Inter simple sequence repeat*) y microsatélites cpSSR (*Chloroplast simple sequence repeat*) (Calistri, Buiatti, & Bogani, 2015).

Todas las técnicas moleculares aplicadas en diversos estudios muestran ser instrumentos muy útiles, que dependiendo de su finalidad, pueden considerarse a unas más informativas que otras. En general, la implementación de marcadores moleculares, sin duda es un recurso importante para la caracterización e investigación de los recursos genéticos. En un banco de germoplasma, el uso de una técnica molecular altamente informativa, potenciaría la identificación del germoplasma útil y contribuiría a la obtención de colecciones vegetales novedosas simplemente a partir de su material genético.

## **1.2 Planteamiento del problema**

El desconocimiento del acervo genético que posee un banco de germoplasma utilizado en programas de mejora, puede representar una gran pérdida de tiempo y recursos invertidos. En el caso particular de *Gypsophila*, por sus características morfológicas, genéticas y agronómicas, se ha visto necesaria la aplicación de polinización libre para la creación de nuevos individuos. Este tipo de polinización involucra la ayuda de insectos o de factores ambientales, como el viento, para lograr su objetivo. Este método es recomendado para flores como *Gypsophila* que requieren de mucha delicadeza en su manipulación debido a su tamaño de flor tan reducido. La desventaja de este tipo de polinización, es el desconocimiento del origen de los nuevos individuos.

Es muy frecuente la utilización del método de caracterización fenotípico, especialmente en bancos de germoplasma de cultivos de importancia económica, como *Gypsophila*. Sin embargo, los datos obtenidos en este tipo de estudio suelen ser subjetivos. Al contrario de una caracterización molecular, un

estudio fenotipo es fuertemente dependiente de la interacción entre el genotipo y el medio ambiente en el que se encuentra el individuo. Factores como temperatura, humedad, nutrientes, luz, plagas y enfermedades, pueden influir directamente en el desarrollo fenotípico de las plantas, haciendo que la toma de datos sea ambigua y no refleje un resultado fidedigno. Esto sumado a la probabilidad de error humano por parte del personal técnico que recolecta la información (FAO, 2014). Además, en ciertas ocasiones la caracterización fenotípica entre variedades de este cultivo se dificulta, debido a la similitud entre sus características o a su complejidad morfológica, especialmente en su estructura floral (Vettori, Schiff, Tani, Pasqualetto, & Bennici, 2013). De igual manera, para llevar a cabo una caracterización fenotípica, es necesario tener plantas totalmente desarrolladas, lo cual implica ocupar mayor espacio físico, aumentar de costos de mantenimiento y finalmente esperar por un largo tiempo hasta completar tanto el desarrollo de las plantas como en toma de datos.

El empleo de técnicas moleculares en estudios de caracterización ha facilitado en muchas formas el estudio de la genética en bancos de germoplasma. Al trabajar con ADN se garantiza que los resultados obtenidos sean exactos, ya que estos no se ven influenciados por factores ambientales, los cuales podrían dar falsos resultados. Sin embargo, la precisión de las estas técnicas puede ser muy variable dependiendo el objetivo del estudio. Hasta el momento, en estudios de *Gypsophila*, se han aplicado técnicas que poseen un alto porcentaje de polimorfismos dudosos y una baja reproducibilidad, lo que pone en duda la confiabilidad de esos resultados obtenidos.

### **1.3 Justificación**

La caracterización de los individuos en un banco de germoplasma, facilita el diseño y aplicación de programas de mejoramiento genético, del mismo modo provee de información valiosa para la replicación de cruces comerciales exitosos. Los estudios con marcadores moleculares, progresivamente han aumentado el

conocimiento en cuanto a diversidad genética y para estudios de caracterización en poblaciones de híbridos comerciales y especies silvestres (Moose & Humm, 2008). Por su rapidez y reproducibilidad, la caracterización molecular ha sido considerada superior en comparación con la caracterización fenotípica. Al emplear el método de caracterización molecular, como en este caso AFLPs, los tiempos se ven notoriamente reducidos debido a que no se necesita esperar el desarrollo total de la planta o el largo periodo de toma de datos que la otra técnica requiere.

La aplicación de marcadores moleculares AFLPs ha facilitado el estudio de diversidad genética en diversas poblaciones, ya que no requieren de un conocimiento previo de la secuencia. Los escasos estudios de caracterización realizados en *Gypsophila sp.*, han sido realizados en países como Italia y Turquía, en híbridos y especies diferentes a los actualmente estudiados. La técnica de AFLP ha demostrado tener una alta confiabilidad y reproducibilidad en sus resultados, comparado con otras técnicas (Calistri, 2015). Además, con el avance de la biotecnología, actualmente se ha incrementado la eficacia de la técnica mediante la adición de marcaje de fluorescencia. El empleo marcaje fluorescente fue propuesto por Schulke (2000), mediante el uso de la sonda de marcaje universal M13 y el fluoróforo FAM-6 en microsatélites, obteniendo como resultado la mejora en la reproducibilidad de este marcador. Posteriormente Stölting et al. (2011) implemento el uso del marcaje universal M13 junto al fluoróforo FAM-6 en la técnica de AFLP, y logro obtener los mismos resultados de potenciamiento de la técnica

Ecuador es el principal país productor de *Gypsophila sp.* a nivel mundial, sin embargo, en el país no se han realizado estudios de caracterización molecular en este cultivo de gran importancia. Este estudio propone potenciar la producción de este cultivo encontrando mayor información que facilite la caracterización de *Gypsophila* para la futura obtención de variedades novedosas que, sin duda, tendrá un aporte para la economía del país (ProEcuador, 2016)

## 1.4 Objetivos

### 1.4.1 Objetivo general

Caracterizar a nivel molecular híbridos comerciales y especies que forman parte de un banco de germoplasma, mediante AFLPs.

### 1.4.2 Objetivos específicos

- a) Optimizar la técnica de AFLP para analizar distancias genéticas del banco de germoplasma de *Gypsophila sp.* en estudio.
- b) Clasificar los híbridos comerciales y especies de *Gypsophila sp.* mediante análisis filogenético.

## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1 Género *Gypsophila*

*Gypsophila sp.* es un género principalmente conocido por su uso como plantas ornamentales. Se las utiliza como flores de corte, el acompañamiento ideal para otras flores, ya que aportan con volumen y luminosidad en los arreglos florales. De igual manera, otras variedades de *Gypsophila sp.* suelen ser cultivadas y comercializadas como ornamento en macetas o para su siembra como plantas de jardín. Dependiendo de la variedad, las plantas empiezan su floración a las 16 semanas de su siembra, y pueden producir varios ciclos de floración durante un periodo de 2 a 3 años. Esta planta crece en países de fotoperiodos extendidos, es decir que tengan mínimo 12 a 13 horas de luz por día. Se desarrollan mejor en suelos secos y calcáreos con buen drenaje. Crecen a una temperatura promedio de 25° C en el día y hasta 15° C en la noche, y son particularmente sensibles a las bajas temperaturas (menores a -5°C) (Danzinger,

2017). En otras regiones, este cultivo se siembra en primavera o verano cuando las condiciones de luz y humedad son las adecuadas, mientras que en el Ecuador posee una gran ventaja, ya que este país posee condiciones constantes de fotoperiodo durante todo el año (ProEcuador, 2016).

## **2.2 Importancia en Ecuador y el mundo**

Existen grandes productores de *Gypsophila sp.* a nivel mundial como: Italia, Israel, Bélgica, Alemania y Holanda, sin embargo, con el pasar del tiempo, países como Ecuador, Egipto y Kenia han sobresalido y se han convertido en importantes productores de este cultivo. (Vettori, Schiff, Tani, Pasqualetto, & Bennici, 2013)

En particular, Ecuador actualmente es considerado el principal productor de *Gypsophila sp.* a nivel mundial, con un 77% de la producción global. (ProEcuador, 2016). Agrocalidad mantiene un registro de 629 fincas habilitadas para la producción y exportación de flores, de las cuales 158 fincas se dedican a la siembra de flores de verano como *Gypsophila sp.*, según los datos existentes del año 2016. Hasta el 2013 se conoce que, el cultivo de *Gypsophila sp.* ha representado el 8,98% del total de exportaciones florícolas del país según el Banco Central del Ecuador. Los destinatarios de estas exportaciones suelen ser: Estados Unidos, Rusia, Brasil, Colombia, Chile, países de la Unión Europea, Corea, entre otros. La mayoría de fincas productoras de este cultivo se encuentran en: Quito, Cayambe, Tabacundo, Machachi, Latacunga, Ambato y Cuenca. (ProEcuador, 2013)

Muchas de las fincas productoras han decidido invertir en programas de mejoramiento genético, con el fin de obtener sus propias variedades que sean atractivas a los consumidores y floristas. Con respecto a *Gypsophila sp.*, las fincas de investigación están en la búsqueda constante de genotipos novedosos con mejores características fenotípicas como: nuevos colores de pétalos,

aumento de número de pétalos, mayor número de flores, inflorescencias más compactas (ProEcuador, 2016).

### 2.3 Clasificación y descripción botánica

*Gypsophila sp.* es un género de plantas perteneciente a la familia de las *Caryophyllaceae* (Tabla 1), que está conformado por alrededor de 424 especies de plantas con una notable diversidad morfológica entre ellas (The Plant List, 2013). Este género tiene su origen en Europa, Asia, África, Islas del Pacífico y Australia. Particularmente Turquía posee cerca de 35 especies endémicas de *Gypsophila sp.* Algunas de sus especies fueron introducidas en América del Norte y América del Sur, donde han sido cultivadas exitosamente como plantas ornamentales de corte y jardín mientras sus híbridos se reproducen principalmente por esquejes, y su germinación se da principalmente en primavera, cuando las condiciones son favorables para su crecimiento. En condiciones naturales estas plantas requieren de al menos 2 a 3 años para su florecimiento, mientras que como para su producción masiva puede ofrecer sus flores en menor tiempo (Darwent & Coupland, 1966).

**Tabla 1.**

*Clasificación taxonómica de Gypsophila sp.*

<b>Reino</b>	<i>Plantae</i>
<b>Subreino</b>	<i>Tracheobionta</i>
<b>División</b>	<i>Magnoliophyta</i>
<b>Clase</b>	<i>Magnoliopsida</i>
<b>Subclase</b>	<i>Caryophyllidae</i>
<b>Orden</b>	<i>Caryophyllales</i>
<b>Familia</b>	<i>Caryophyllaceae</i>
<b>Género</b>	<i>Gypsophila sp. L.</i>

Tomado de USDA, 2017.

Sus inflorescencias poseen numerosas y pequeñas flores dispuestas en panícula que pueden ser del tipo simple o doble (Pringle, 2017) (Figura 1). Particularmente el género *Gypsophila sp.* tiene flores hermafroditas, actinomorfas y con simetría radial. Poseen 5 sépalos libres y conectados en posición basal y dependiendo de la especie tendrán de 5 a 10 pétalos (Carr, 2006). El androceo se compone de 8 a 10 estambres obdiplostemonos, es decir, dispuestos en 2 verticilos alternados. Son hipóginos o algunas veces periginosos y sus anteras se dividen en dos lóbulos. El gineceo se compone de 2 a 5 carpelos. Posee ovario súpero, sincarpo, unilocular y con placentación libre central. En cuanto a sus características de color, estas dependerán de la variedad cultivada, siendo el color blanco el más requerido entre los compradores, aunque también hay variedades en tonos rosado o rosa-purpura. (Danzinger, 2017)



**Figura 1.** a) *Gypsophila sp. var. Over Time*, híbrido comercial con flor de panícula doble. b) *Gypsophila repens*, especie silvestre que posee una flor con panícula simple (Derecha).

Los tallos son herbáceos y de color verde. Son abiertamente ramificados y dispersos, poseen nodos hinchados en las partes donde las hojas se adhieren (Figura 2). Dependiendo de la especie, pueden ser erectos o rastreros y pueden medir desde 5 cm hasta 1.2 metros de alto. Las hojas son simples, sésiles o

subsésiles y algunas veces pecioladas. Pueden medir de 2 a 7 cm y están dispuestas a lo largo del tallo en forma opuesta en cada nodo. El borde de la hoja es entero, es decir no posee dientes o lóbulos. Son largas y pueden tener forma lineal, lanceolada, oblonga u ovalada, con ápice redondeado, agudo u obtuso (USDA, 2017).



**Figura 2.** Morfología del tallo y hojas de *Gypsophila paniculata* L., donde se observan los nodos característicos de esta planta y un par de hojas lanceoladas que provienen de cada uno.

Los frutos son cápsulas esféricas u oblongas, uniloculares, dehiscentes, compuesta de 4 valvas y miden de 4,5 a 5 mm y sus semillas son de color negro de textura rugosa en forma de frijol o disco, que llegan a medir de 1 a 2 mm (CDFA, 2015) (Figura 3).



**Figura 3.** Semillas características de *Gypsophila panniculata* L.

## 2.4 Métodos de caracterización molecular

Nuevos métodos de genotipado y análisis molecular han sido creados para el estudio de diversidad genética. Dependiendo del tipo de investigación, el alcance y experiencia disponible, se puede escoger entre varias técnicas moleculares (Jorge & Hanson, 2017). En el caso de *Gypsophila* sp., se han realizado estudios con marcadores moleculares a partir de ADN, los cuales se basan en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) tales como RAPDs (*Random amplified polymorphic DNA*), AFLPs (*Amplified fragment length polymorphism*), SSRs (*Simple sequence repeat*) o ISSRs (*Inter-simple sequence repeat*). En estudios como el de Calistri et al., (2015), Martínez et al., (2013) y Korkmaz et al., (2015) se ha comparado la eficacia de cada método mencionado y han proporcionado información importante para este estudio.

### 2.4.3 AFLPs

Los polimorfismo de longitud de fragmentos, o por sus siglas en inglés, AFLPs (*Amplified fragment length polymorphism*) son marcadores moleculares basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), ampliamente utilizados en estudios de diversidad genética. Los AFLPs utilizan enzimas para la digestión

del material genético, seguido de la ligación de adaptadores en los extremos de los fragmentos digeridos. A continuación, parte de esos fragmentos se amplifica selectivamente mediante cebadores complementarios a los adaptadores para finalmente ser analizados. Existen dos formas por las cuales pueden ser observados. De manera manual, mediante geles de poliacrilamida o de forma automatizada, por medio de equipos de electroforesis capilar que emplean metodologías de fluorescencia (Vos, Hogers, & Bleeker, 1995). En los dos tipos de resultados se visualizan bandas o picos, respectivamente, que muestran la ausencia o presencia de alelos, por esto son considerados como marcadores dominantes.

Los AFLPs marcadores moleculares que permiten la detección de polimorfismos en distintos sitios del genoma, que no requieren del previo conocimiento del genoma estudiado. Es utilizada en estudios de identificación de individuos, en la determinación de variabilidad y distanciamiento genético entre individuos o poblaciones y en estudios de filogenia y análisis de parentesco (Muller & Wolfenbarger, 1999). La alta fiabilidad de los AFLP podría desplazar a marcadores como los RAPD, mientras que por su facilidad de ejecución podría reemplazar parcialmente a técnicas como los microsatélites, por lo menos en problemas particulares que presente la investigación. Sin embargo la naturaleza dominante de los AFLP hace que difícilmente compita con marcadores codominantes como microsatélites, que sin más poderosos en análisis genéticos de poblaciones (Muller & Wolfenbarger, 1999)

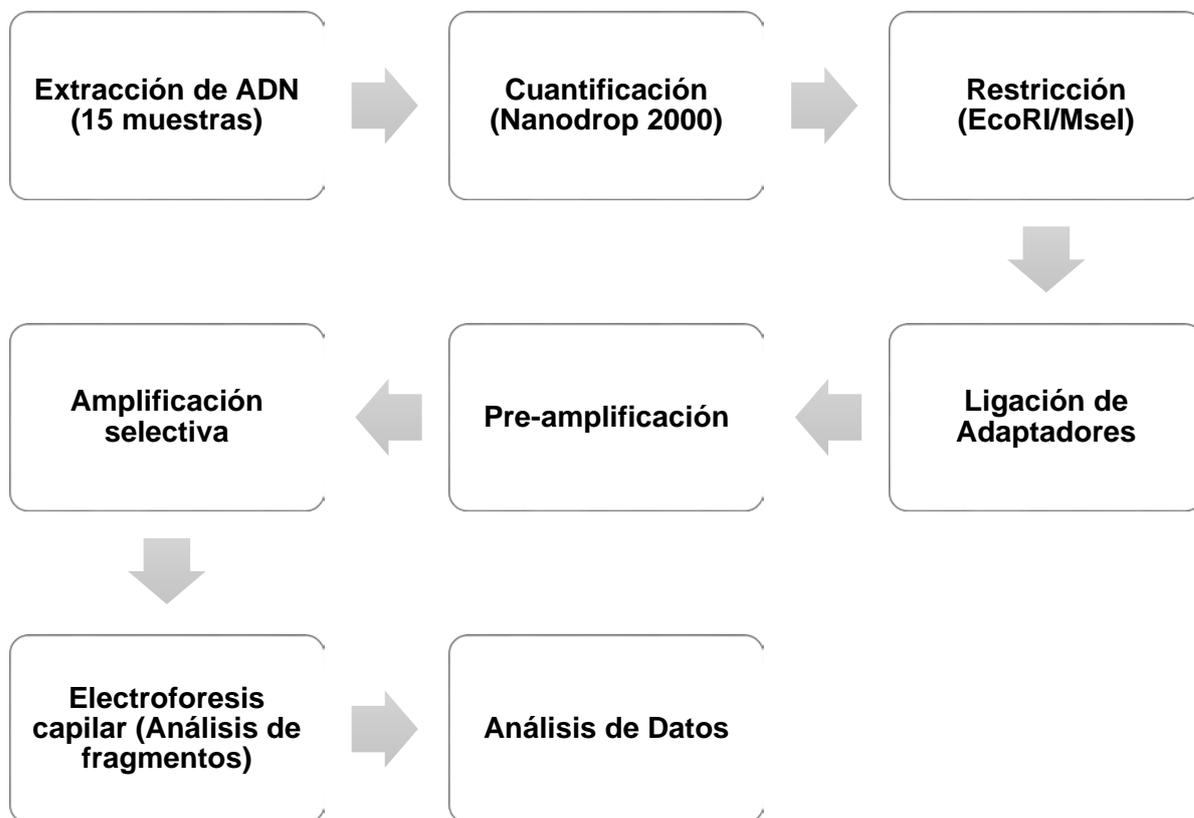
Estudios realizados en *Gypsophila sp.*, los AFLPs han mostrado ser buenos instrumentos de diferenciación genética. Como en el estudio de Calistri (2015), donde los resultados de AFLPs mostraron el mayor número de productos de PCR aunque su nivel de polimorfismo fue ligeramente menor al obtenido por los ISSRs. Sin embargo un estudio de Martínez et al (2013), en el cual se distinguió la diversidad y estructura genética de la especie *Gypsophila struthium*, para esto se realizó una amplificación con marcaje fluorescente por medio de electroforesis capilar. En este estudio se determinó una baja significancia de la diversidad

genética entre subespecies, debido a su cercanía y reciente diversificación entre los individuos. Hasta ahora no existe un protocolo eficiente de AFLP con marcaje por medio de electroforesis capilar, por lo cual se debe adaptar y estandarizar los protocolos según la población a estudiarse, especialmente para aquellos genomas complejos o desconocidos como en el caso de *Gypsophila sp.* (Hasbún, Iturra, & Moraga, 2012).

### 3. DISEÑO EXPERIMENTAL

Para el presente estudio se utilizó plantas *in vivo* pertenecientes a un banco de germoplasma de *Gypsophila sp.* Las cuales se procesaron y analizaron mediante electroforesis capilar en un analizador de ADN ABI 3730xL. Los datos obtenidos se resolvieron en el software de análisis bioinformático *GeneMarker 2.7.0.* (SoftGenetics, 2017) que generó una matriz binaria de bandas compiladas. Posteriormente, se utilizó esta matriz en el software de análisis de disimilitud *DARwin 6* (Perrier & Jacquemoud-Collet, 2006), para el cálculo de estimación de la diversidad utilizando el coeficiente de *Jaccard* (Jaccard, 1901). De igual manera, en este mismo programa se generó el análisis de agrupamientos (*clusters*) basados en las distancias genéticas junto con un dendrograma por medio del algoritmo *Neighbor joining*, con el cual se elaboró el árbol filogenético que permitió conocer sobre la distribución de los individuos.

### 3.1 Diagrama de flujo



**Figura 4.** Diagrama de flujo del estudio.

## 4. PROCEDIMIENTOS

El presente proyecto se desarrolló en la parroquia rural de El Quinche, ubicada a 32 Km. de la ciudad de Quito, en la provincia de Pichincha. Se encuentra a una altitud de 2,631 m.s.n.m. Posee un clima templado y cálido, con un promedio de temperatura 15° C al año y un promedio anual de precipitaciones de 796 mm (Merkel, 2012). Esta localidad posee las condiciones adecuadas para el cultivo de *Gypsophila sp.*, y es donde actualmente ya existen empresas de producción importantes como Hilsea Investment Limited.

#### 4.1 Determinación de la población y muestra

La población a estudiarse provino del banco de germoplasma de *Gypsophila sp.* perteneciente a la empresa *Esmeralda Breeding and Biotechnology*, la cual es una empresa especializada en el mejoramiento genético de variedades de flores, tanto en rosas como en las denominadas “flores de verano”. La población experimental constó de 15 individuos que incluyeron 4 especies y 11 híbridos comerciales (Tabla 2). El criterio de selección de los individuos se basó en la importancia y frecuencia de utilización de las plantas en programas de mejoramiento por cruces.

**Tabla 2.**

*Material vegetal estudiado.*

<b>Individuo</b>	<b>Grupo</b>
<b>1</b>	Especies
<b>2</b>	Especies
<b>3</b>	Especies
<b>4</b>	Especies
<b>5</b>	Híbrido Comercial
<b>6</b>	Híbrido Comercial
<b>7</b>	Híbrido Comercial
<b>8</b>	Híbrido Comercial
<b>9</b>	Híbrido Comercial
<b>10</b>	Híbrido Comercial
<b>11</b>	Híbrido Comercial
<b>12</b>	Híbrido Comercial
<b>13</b>	Híbrido Comercial
<b>14</b>	Híbrido Comercial
<b>15</b>	Híbrido Comercial

## 4.2 Recolección de material vegetal

El procedimiento inició con la recolección de las muestras de material vegetal proporcionadas por el banco de germoplasma de la Empresa *Esmeralda Breeding and Biotechnology*. Se seleccionaron, de 3 a 4 hojas jóvenes, libres de plagas, enfermedades e impurezas, provenientes de la parte baja de las plantas. Una vez recolectadas, las hojas se envolvieron en una lámina de papel aluminio estéril. Se le realizó la rotulación correspondiente y se colocó en nitrógeno líquido para su preservación.

## 4.3 Extracción de ADN y cuantificación

El procedimiento de extracción utilizado se basó en el método de extracción estándar por CTAB de Doyle y Doyle, (1987). Sin embargo, para estandarizar la extracción para este cultivo, se modificaron ciertos pasos del protocolo.

El procedimiento inicio a partir del material vegetal previamente recolectado, que se colocó en un mortero frio, se añadió nitrógeno líquido y se maceró con el pistilo hasta obtener un polvo muy fino. A continuación, se colocó 120 g del polvo macerado en un microtubo de 2 mL en el que se añadió 800µl de tampón CTAB 2X y 8µl de 2, β-mercaptoetanol. La mezcla se homogenizó en un vórtex y se incubó a 62° C por 60 minutos, realizando una agitación cada 15 minutos. Posterior al tiempo de incubación se añadió 500µl de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) y se mantuvo un reposo por 20 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se centrifugó las muestras a 13200 rpm por 20 minutos, luego de lo cual se recuperó el sobrenadante en un nuevo tubo. Luego, se añadió 2 volúmenes de etanol al 96% y 40µl de acetato de sodio, se centrifugó la mezcla a 13000 rpm por 5 minutos. A continuación, se descartó el sobrenadante y se visualizó un *pellet*, al cual se lo lavó con 800µl etanol al 75%. Se agitó el tubo hasta que se despegó el *pellet*, se removió el etanol y se lo dejó secar dentro de la cámara de flujo. Finalmente, se suspendió el *pellet* en 50µl de tampón TE (1X) y se almacenó las muestras a -20° C.

Para confirmar la presencia de ADN, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1.5% y una cuantificación en el espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, 2017). Se diluyó el ADN a una concentración de 100 ng/μl para su posterior uso en las reacciones de amplificación por PCR.

#### 4.4 Digestión y ligación de adaptadores

La digestión del ADN se realizó con las enzimas *EcoRI* y *MseI* en un volumen final de 40μl. Para realizar la reacción de digestión se colocó 10μl de ADN (100 ng/μl), 0.3μl de *EcoRI* (15 U/μl), 0.5μl de *MseI* (10 U/μl), 4μl de tampón PCR 10X y 25.2μl de agua PCR, y se los incubo por 1 hora a 37° C. Terminada la incubación, se añadió 10μl de la mezcla de ligación que contenía: 1μl de adaptador *EcoRI* (5 pmol/μl), 1μl de adaptador *MseI* (50 pmol/μl), 1μl de tampón PCR (10X), 0.3μl de ligasa T4 (3u/μl), 1μl de ATP (10Nm) y 5.7μl de agua PCR, y se continuo la incubación por 3 horas a 37° C. Los adaptadores utilizados se prepararon a partir de las secuencias *forward* y *reverse* de las enzimas *EcoRI* y *MseI* (Tabla 3). Finalmente, el producto de ligación se diluyó en 150μl de tampón T<sub>10</sub>E<sub>0.1</sub>.

**Tabla 3.**

*Secuencias de adaptadores*

<b>Adaptador</b>	<b>Secuencia (5' - 3')</b>
<b>Adaptador <i>EcoRI forward</i></b>	CTCGTAGACTGCGTACC
<b>Adaptadores <i>EcoRI reverse</i></b>	AATTGGTACGCAGTCTAC
<b>Adaptadores <i>MseI forward</i></b>	GACGATGAGTCCTGAG
<b>Adaptadores <i>MseI reverse</i></b>	TACTCAGGACTCAT

Adaptado de Vuylsteke, et al, 2007.

#### 4.5 Pre-amplificación

La pre-amplificación se realizó en un volumen final de 50µl que contenía 5µl de la mezcla molde del paso anterior y 45µl de la mezcla de pre-amplificación. La mezcla de pre-amplificación contenía 1.5µl de cebador *EcoRI*+A (50ng/ul), 1.5µl de cebador *MseI*+C (50ng/ul), 5µl de tampón PCR 10X, 2.5µl de MgCl<sub>2</sub> (50mM), 1µl de dNTPs (10mM), 0.2µl de Taq polimerasa (5U) y 33.3µl de agua PCR. Los cebadores pre-selectivos utilizados en este paso se muestran en la Tabla 4. Las condiciones de PCR fueron: 25 ciclos de 94° C (30s), 56° C (1min) y finalmente 72° C por 1 min.

A continuación, se realizó una electroforesis de los productos de pre-amplificación en un gel de agarosa al 1.5% a 60V por 20 min para verificar el éxito de la pre-amplificación. Finalmente el producto de pre-amplificación se diluyó 10 veces con tampón T<sub>10</sub>E<sub>0.1</sub>.

**Tabla 4.**

*Secuencias de cebadores Pre-selectivos.*

<b>Cebadores Pre-selectivos</b>	<b>Secuencia ( 5' - 3')</b>
<b>PS -<i>EcoRI</i></b>	GACTGCGTACCAATTCA
<b>PS -<i>MseI</i></b>	GATGAGTCCTGAGTAAC

Adaptado de Vuylsteke, Peleman y Eijk, 2007, pp 6

#### 4.6 Amplificación selectiva

Para la amplificación selectiva se utilizaron 6 diferentes combinaciones de cebadores, las cuales se realizaron a partir de los cebadores descritos en la Tabla 5. Las combinaciones finales utilizadas en el proyecto fueron: *EcoRI*-M13-3 + *MseI*3, *EcoRI*-M13-2 + *MseI*1, *EcoRI*-M13-1+ *MseI*4, *EcoRI*-M13-3 + *MseI*8, *EcoRI*-M13-4 + *MseI*2 y *EcoRI*-M13-5 + *MseI*8. La reacción de PCR tuvo un volumen final de 30µl y consistió en 7.5µl de muestra molde del paso anterior y

22.5µl de mezcla de selección. La mezcla de selección consistió en 0.4µl de cebador selectivo *EcoRI-M13-x*, 1.5µl de cebador *Mselx*, 3µl de tampón PCR (10X), 2.8µl de MgCl<sub>2</sub> (50mM), 0.8µl de dNTPs (10mM), 0.2µl de Taq polimerasa (5U), 12.4µl de agua PCR y 1.5µl de sonda M13-6 FAM. Las condiciones utilizadas para la PCR iniciaron con una temperatura de 94° C (2min), seguido de 10 ciclos de PCR *Touch Down* (PCR-TD) a 94° C (30seg), 65° C (disminuyendo 1° C por ciclo) (30seg), y finalmente 72° C (60seg). A este PCR-TD le siguió 30 ciclos adicionales a una temperatura de *annealing* constante de 56° C y por ultimo una temperatura de elongación final de 72° C (30min) (Stölting, et al., 2011). Posterior a la amplificación selectiva se realizó una comprobación rápida de los productos, mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5% a 60V por 20 min con 5 de las muestras en estudio.

**Tabla 5.**

*Secuencia de cebadores selectivos y sonda de marcaje fluorescente.*

<b>Cebadores selectivos</b>	<b>Secuencia ( 5' - 3')</b>
<b><i>Msel1</i></b>	GATGAGTCCTGAGTAACAA
<b><i>Msel2</i></b>	GATGAGTCCTGAGTAACAC
<b><i>Msel3</i></b>	GATGAGTCCTGAGTAACAG
<b><i>Msel4</i></b>	GATGAGTCCTGAGTAACAT
<b><i>Msel5</i></b>	GATGAGTCCTGAGTAACTA
<b><i>Msel8</i></b>	GATGAGTCCTGAGTAACTT
<b><i>EcoRI-M13-1</i></b>	TGTAAAACGACGGCCAGTGACTGCGTACCAATTC ACT
<b><i>EcoRI-M13-2</i></b>	TGTAAAACGACGGCCAGTGACTGCGTACCAATTCACA
<b><i>EcoRI-M13-3</i></b>	TGTAAAACGACGGCCAGTGACTGCGTACCAATTC AAC
<b><i>EcoRI-M13-4</i></b>	TGTAAAACGACGGCCAGTGACTGCGTACCAATTCAGC
<b><i>EcoRI-M13-5</i></b>	TGTAAAACGACGGCCAGTGACTGCGTACCAATTC AAG

Adaptado de Martiez Nieto, et al, 2013.

#### **4.7 Análisis de fragmentos y procesamiento de datos**

El análisis de fragmentos de las muestras fue realizado mediante electroforesis capilar, por la empresa MacroGen, Inc. localizada en Seul, Corea del Sur. Para su envío se colocó 20 µl de cada muestra en bandejas de 96 pocillos; cuidando el orden, identificación y sellado de las mismas. Las bandejas fueron selladas y envueltas en plástico para posteriormente colocarse en una caja para su envío por correo.

Los resultados devueltos fueron ingresados en el software *GeneMarker 2.7.0*, del cual se utilizó el instrumento de análisis de los polimorfismos de longitud de fragmentos amplificados (AFLP) para procesar los datos en estudio. Al final de este análisis se obtuvo una tabla binaria que mostró la presencia o ausencia de las bandas polimórficas. La misma tabla binaria fue sometida a un proceso de depuración de datos y finalmente fue ingresada en el software de análisis de disimilitud *DARwin 6* para la obtención de la matriz de disimilitud, distancias genéticas mediante el análisis de componentes principales (ACP) y un dendrograma por medio del algoritmo *Neighbor joining*.

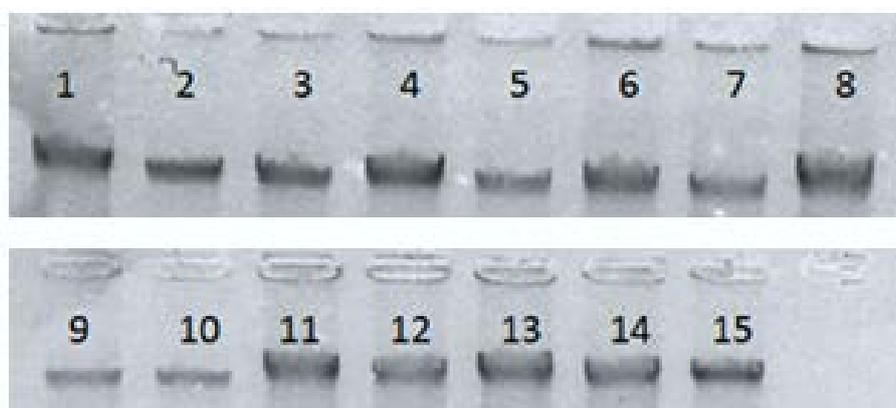
### **5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

#### **5.1 Extracción de ADN**

Como resultado de este paso se demostró que el método de extracción empleado fue efectivo ya que se pudo observar claramente la presencia de bandas de ADN con alto peso molecular como lo muestra la Figura 5. Sin embargo, también se observó un ligero barrido por debajo de estas. Según Hills & van Staden (2002) este barrido podría deberse a la presencia de fenoles propios del tejido de la planta en estudio. Por otro lado, estudios como el de Galindo-Tobar (2014) aseguran que, la aparición de barridos en el gel de electroforesis del ADN extraído con este método, se debe a la presencia de

contaminación, posiblemente de proteínas. También se menciona que, la utilización de este tipo material genético no representa un inconveniente en su aplicación para técnicas de marcadores moleculares, ya que al realizar una PCR de prueba utilizando un cebador de RAPD, al final se observó la amplificación exitosa de los productos de PCR.

En el presente estudio, se decidió considerar los resultados del trabajo de Galindo-Tobar (2014) y se continuó con la realización del procedimiento de AFLPs.



**Figura 5.** Electroforesis en gel de garosa al 1.5% de los productos de extracción de ADN. Donde se observa la presencia del material del genético.

Para corroborar este resultado se realizó la cuantificación de cada una de las muestras en el espectrofotómetro NanoDrop 2000. Se observó que las concentraciones resultantes fueron muy altas y de buena calidad en todas las muestras (Tabla 6). Debido a que se obtuvo valores de concentración muy altos, se realizó una dilución hasta obtener una concentración aproximada de 100 ng/ $\mu$ L; concentración requerida para su aplicación en el protocolo de AFLPs. Asimismo, se obtuvieron valores de pureza de cada muestra mediante la relación entre las absorbancias de 260/280 (nm) y 260/230 (nm) (Tabla 6). Usualmente, para validar un ADN de alta pureza, se asume que la relación 260/280 deben tener un valor de 1.7 - 2.0. Una lectura menor a 1.6 no necesariamente hace obsoleto este ADN para ninguna aplicación, sin embargo niveles más bajos

indican contaminación presente. De igual manera en la relación 260/230 el rango aceptable se encuentra en 1.8. Donde las variaciones de este rango se pueden deber a contaminación con compuestos orgánicos como proteínas, más sin embargo se tiene como pauta que el valor de relación 260/230 sea siempre mayor a 1.5. (Promega Corporation, 2017)

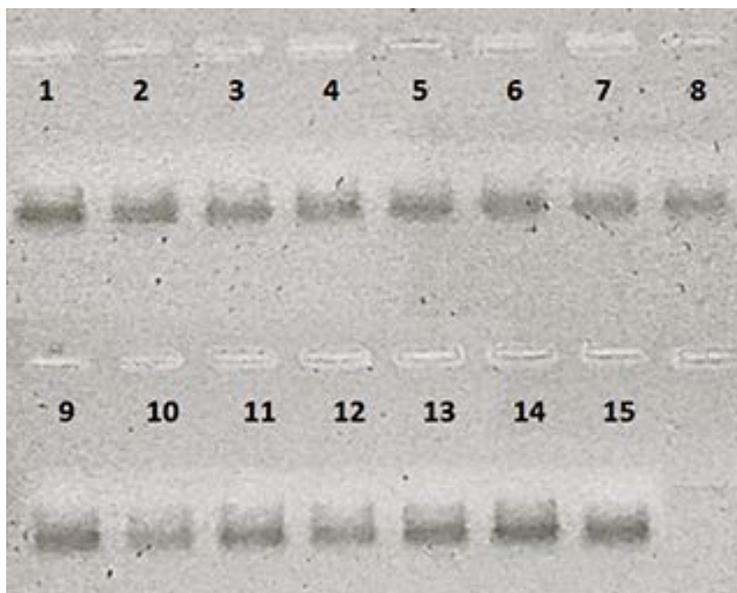
En el presente estudio, la relación 260/280 arrojó valores entre 2.07 a 2.13, los cuales son levemente mayores al rango esperado, pero que sin embargo no representan un indicativo de problemas y que por lo tanto son considerados aceptables según el manual de interpretación de relaciones de absorbancias de Thermo Fisher Scientific, 2017. Del mismo modo, en la relación de absorbancias de 260/230, se obtuvo valores entre 1.44 y 1.98, los cuales se consideran más variantes en su rango esperado. En este caso, el resultado de la relación 260/230, genera un valor que indican la contaminación de los ácidos nucleídos con residuos orgánicos, posiblemente proteínas según lo demostrado por Galindo-Tobar.

**Tabla 6.***Concentraciones de ADN de las muestras utilizadas.*

<b>INDIVIDUO</b>	<b>CONCENTRACIÓN (ng/<math>\mu</math>L)</b>	<b>260/280</b>	<b>260/230</b>
<b>1</b>	6361.0	2.07	1.72
<b>2</b>	1144.3	2.12	1.81
<b>3</b>	1422.0	2.1	1.76
<b>4</b>	3373.7	2.11	1.77
<b>5</b>	2033.8	2.13	1.64
<b>6</b>	3730.6	2.10	1.81
<b>7</b>	1329.9	2.16	1.45
<b>8</b>	6519.8	2.07	1.76
<b>9</b>	5584.7	2.06	1.81
<b>10</b>	520.9	2.08	1.69
<b>11</b>	2228.7	2.10	1.78
<b>12</b>	5354.4	2.11	1.84
<b>13</b>	4952.1	2.12	1.98
<b>14</b>	1196.3	2.04	1.44
<b>15</b>	2795.5	2.11	1.90

**5.2 Pre-amplificación.**

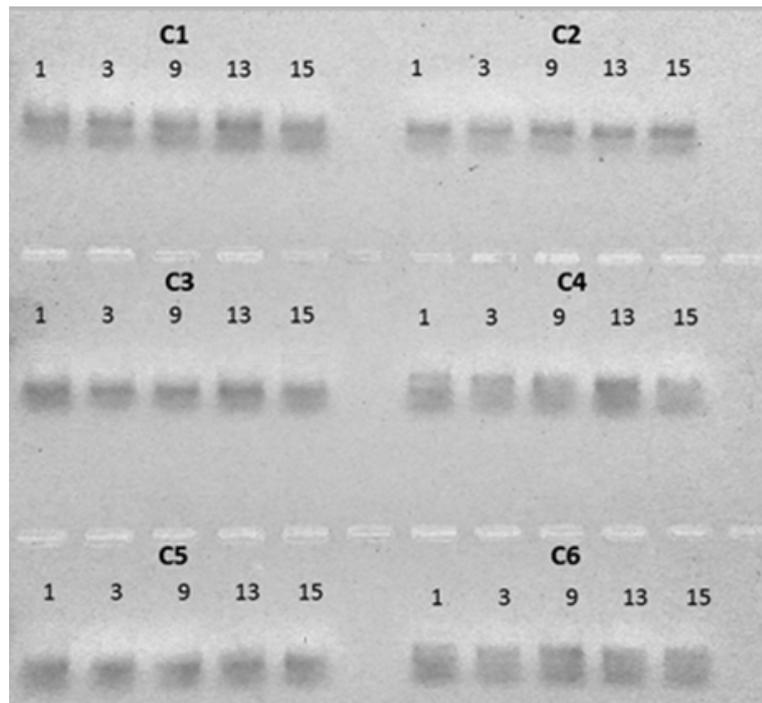
Se confirmó que las condiciones empleadas en la pre-amplificación con los cebadores anteriormente mencionados fueron las adecuadas, mediante lo observado en el gel de agarosa (Figura 6). El gel realizado requería de la visualización de bandas en forma de barrido, es decir, no necesariamente bien definidas, en el rango de 100 a 500 pb. Con este resultado se pudo comprobar la unión de los cebadores selectivos a los adaptadores y por lo tanto dio paso a la continuación de la siguiente etapa del procedimiento que es la amplificación selectiva.



**Figura 6.** Electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, de los productos de pre-amplificación de las 15 muestras en estudio. Utilizando un *ladder* de 100 pb. Donde se muestra un barrido que confirmando una pre-amplificación exitosa.

### 5.3 Amplificación selectiva.

Finalizada la amplificación selectiva se realizó una electroforesis de las 6 combinaciones de cebadores, en 5 de las 15 muestras; con el fin de comprobar si la amplificación selectiva fue exitosa. En el gel de agarosa se observó la presencia de bandas acumuladas en forma de barrido en el rango de 50 a 500 pares de bases, lo cual confirmó el éxito de la amplificación selectiva (Figura 7).



**Figura 7.** Electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % de 5 muestras amplificadas selectivamente con las 6 diferentes combinaciones.

Hasta el momento la electroforesis en gel de agarosa, tanto para la pre-amplificación como para la amplificación selectiva, ha sido un método de comprobación parcial de la unión de los cebadores específicos para cada caso. En el siguiente paso de este estudio se optó por el análisis de fragmentos por medio de electroforesis capilar, ya que es una técnica eficaz, que permite la separación de las bandas obteniendo una mayor resolución y en un tiempo más corto. (Lauer & Rozing, 2014).

#### 5.4 Análisis de fragmentos y procesamiento de datos

Para el análisis de fragmentos mediante electroforesis capilar, las muestras fueron enviadas a la empresa Macrogen, en Corea del Sur. Estas fueron procesadas según las condiciones del marcador 6-FAM y considerando un tamaño estándar de 500 pb. Posteriormente los resultados del análisis fueron devueltos de forma electrónica en formato .fsa.

#### 5.4.1 *GeneMarker 2.7.0*

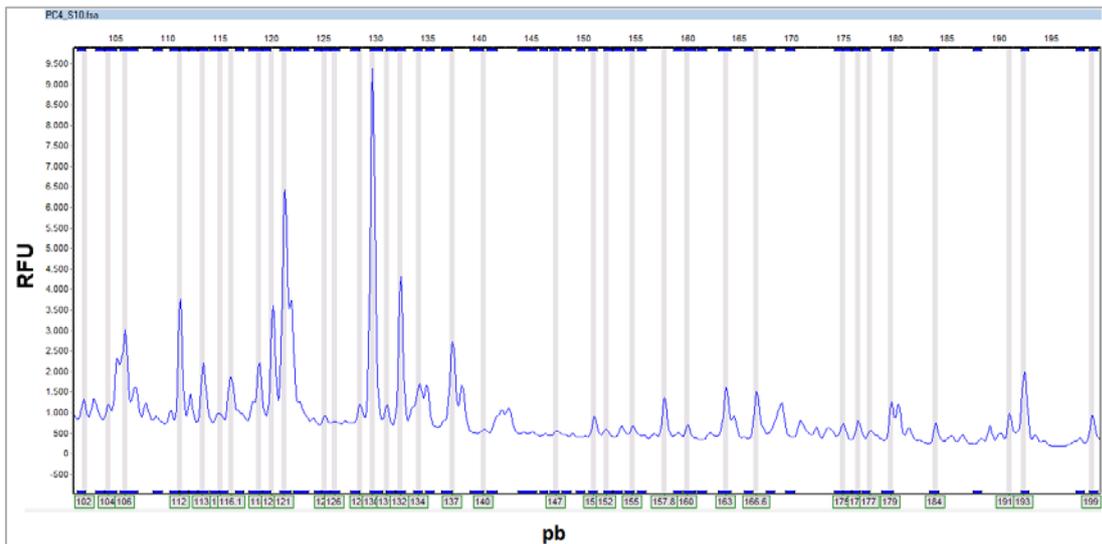
Los datos del análisis de fragmentos fueron recibidos e ingresados en el software de análisis *GeneMarker 2.7.0* en el cual, después de utilizar su técnica de análisis de AFLPs, se obtuvo múltiples resultados informativos.

El protocolo de AFLP empleado en las 15 muestras estudiadas amplificó selectivamente para las 6 combinaciones de cebadores, sin embargo algunas de ellas demostraron ser más informativas que otras. Esto se debió a que los cebadores empleados, no han sido utilizados anteriormente en los individuos *Gypsophila sp.* de este estudio y por ende se esperaba una variación de los porcentajes de polimorfismos obtenidos.

Como se ha mencionado inicialmente, el marcaje molecular mediante AFLP es una técnica cuya amplificación selectiva depende de los fragmentos generados por las enzimas de restricción, de la separación de las bandas y de su porcentaje de expresión en cada muestra (Vos et. al, 1995). En este estudio el uso de las enzimas *EcoRI* y *MseI*, generaron un número de fragmentos limitado debido al tipo de corte que posee cada una. Como se puede observar en los geles sintéticos no se generó una gran cantidad de bandas lo cual ayudo en el análisis y conteo de la expresión. Adicionalmente, la modificación del protocolo original con respecto a al marcaje directo de los cebadores, proporcionó una eficiencia de PCR similar a estudios de fluorescencia de microsatélites y además significo una reducción significativa de los costos del proyecto. (Blacket, Robin, Good & Miller, (2012)

Los resultados de la amplificación de fragmentos observados en los geles sintéticos fueron acompañados de sus respectivos electroferogramas, generados automáticamente por el software para cada una de las muestras. Los electroferogramas representaron cada uno de los fragmentos amplificados en forma de picos, como lo muestra el ejemplo de la Figura 8. Gracias a la información que proporciona el electroferogramas, en cuanto a tamaño e

intensidad, fue posible el realizar un ajuste manual de los datos generados automáticamente.



**Figura 8.** Electroferograma de la muestra 10 con la combinación de cebadores número 4.

Los resultados obtenidos por el software *GeneMarker 2.7.0* se caracterizan por ser estimaciones muy precisas en cuanto a la determinación del tamaño y movilidad de los fragmentos de ADN. Sin embargo, para garantizar la calidad del análisis de datos y la producción de una matriz binaria confiable, se requiere de modificaciones del análisis automatizado (Holland, Clarke, & Meudt, 2008). Es por esto que se realizó un ajuste manual de los datos obtenidos, donde se mejoró la resolución de los caracteres informativos.

Para el ajuste manual se tomaron en cuenta ciertos parámetros que determinarían el polimorfismo de los fragmentos, en este caso se estableció que una banda se puede considerar polimórfica al tener una intensidad de fluorescencia mayor a 200 RFU y un tamaño mínimo de 1,5pb (Holland, Clarke, & Meudt, 2008). Al final de este ajuste se realizó un conteo del número total de bandas de cada combinación, y cuántas de estas bandas fueron polimórficas. Con estos datos se realizó el cálculo para obtener del porcentaje de polimorfismo de cada combinación empleada mediante la Ecuación 1:

$$\text{Porcentaje de polimorfismo} = \frac{\# \text{Bandas polimórficas}}{\# \text{Bandas totales}} \times 100 \quad (\text{Ecuación 1})$$

Finalmente se obtuvo un total de 295 bandas de las cuales 173 se consideraron polimórficas obteniendo un porcentaje de polimorfismo promedio de 58.6% entre los 15 genotipos estudiados con las 6 combinaciones empleadas. El número de bandas por combinación estuvo en un rango de 6 a 68, dependiendo la combinación (Tabla 7).

El ajuste manual de los datos marco una diferencia significativa en los resultados, ya que algunas bandas detectadas en el análisis manual no fueron consideradas, a pesar de tener una distancia e intensidad aceptables según la bibliografía antes mencionada. El análisis banda por banda puede ser un proceso muy demorado pero sin embargo al final garantiza resultados de mayor calidad. (Holland, Clarke & Meudt, 2008)

**Tabla 7.**

*Porcentaje de polimorfismos obtenidos.*

<b>Combinaciones</b>	<b>Número total de bandas</b>	<b>Número de bandas polimórficas</b>	<b>Porcentaje de polimorfismo</b>
C1	52	30	57.69 %
C2	13	6	46.15 %
C3	64	38	59.37 %
C4	62	32	51.61 %
C5	53	31	58.49 %
C6	51	36	70.58 %

Además de los electroferogramas, el software generó automáticamente una matriz binaria para cada una de las combinaciones de cebadores utilizadas. En la tabla binaria, la presencia de un fragmento amplificado se representó con el número 1 y su ausencia con el número 0. Las matrices binarias generadas, incluían los cambios realizados en el ajuste manual de las bandas por lo que no

hubo necesidad de un segundo ajuste. A continuación se concatenó las matrices de cada combinación de cebadores en una sola matriz general, la cual fue utilizada en el análisis de disimilitud para determinar el distanciamiento genético realizado por el software de disimilitud *DARwin 6*.

#### **5.4.2 *DARwin 6***

Continuando con la búsqueda de información, se realizó el cálculo de los valores de disimilitud, para esto se ingresó la matriz concatenada en el software *DARwin 6*. En el cual, se partió con el ingreso de los parámetros en los que se deben evaluar los datos de la matriz binaria. Para comenzar, se eligió al coeficiente de *Jaccard* como estadística para medir el grado de similitud entre los individuos estudiados.

Se escogió este coeficiente debido a que relaciona la probabilidad de que, una banda de un individuo también se puede encontrar en otro; sin importar cuan abundantes sean estas bandas. Esto les da importancia a aquellas bandas escasamente repetidas, que sin duda pueden aportar con información valiosa del distanciamiento. Complementario a este coeficiente estadístico, también se utilizó la opción *bootstrap* para verificar su confiabilidad de la distribución de la población en estudio. El número de repeticiones *bootstrap* se recomienda según el grado de precisión que se desea obtener, entendiéndose que a mayor valor de *bootstraps* se disminuirá el valor de error y aumentara la confiabilidad de los resultados. Para este estudio se tomó en consideración los valores sugeridos por Badii, Castillo, Wong, & Landeros, (2006) donde se sugiere que un valor de *bootstrap* de 1000, es el indicado para calcular índices de confianza (IC) y así tener mayor precisión en el cual es considerado óptimo para el tipo de análisis y la muestra utilizada.

El método empleado en el presente estudio considera a los componentes de la matriz como valores cuantitativos, que muestra los valores de distanciamiento entre cada uno de los individuos (Tabla 8). La tabla de disimilitud contenía

valores en un rango de 0 a 1, donde los valores próximos a 0 mostraron una mayor cercanía entre los individuos, y los valores cercanos a 1 indicaron un mayor distanciamiento. Esta matriz fue el resultado del promedio de las mil repeticiones de los *bootstraps* seleccionados inicialmente, y tal como lo sugirió Badii et al., (2006) se mostró como la probabilidad de error disminuía al seleccionarse un mayor número de repeticiones.

**Tabla 8.**

*Matriz de Disimilitud en DARwin 6.*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	0														
2	0.528	0													
3	0.624	0.352	0												
4	0.727	0.711	0.752	0											
5	0.493	0.526	0.594	0.692	0										
6	0.797	0.779	0.769	<b>0.841</b>	0.741	0									
7	0.455	0.540	0.638	0.705	<b>0.278</b>	0.732	0								
8	0.507	0.530	0.634	0.782	0.412	0.780	0.392	0							
9	0.469	0.593	0.669	0.716	0.420	0.778	0.390	0.333	0						
10	0.408	0.561	0.653	0.707	0.456	0.784	0.406	0.530	0.442	0					
11	0.671	0.669	0.661	0.741	0.604	0.742	0.554	0.602	0.568	0.565	0				
12	0.786	0.737	0.712	0.818	0.756	0.795	0.719	0.697	0.669	0.775	0.633	0			
13	0.692	0.713	0.687	0.748	0.676	0.765	0.597	0.646	0.621	0.606	0.490	0.604	0		
14	0.473	0.567	0.645	0.712	0.400	0.752	0.368	0.412	0.348	0.434	0.604	0.685	0.636	0	
15	0.466	0.599	0.636	0.662	0.493	0.811	0.421	0.464	0.403	0.439	0.626	0.695	0.479	0.472	0

Nota: Valores cercanos a 0 = menor distancia, Valores cercanos a 1 = mayor distancia

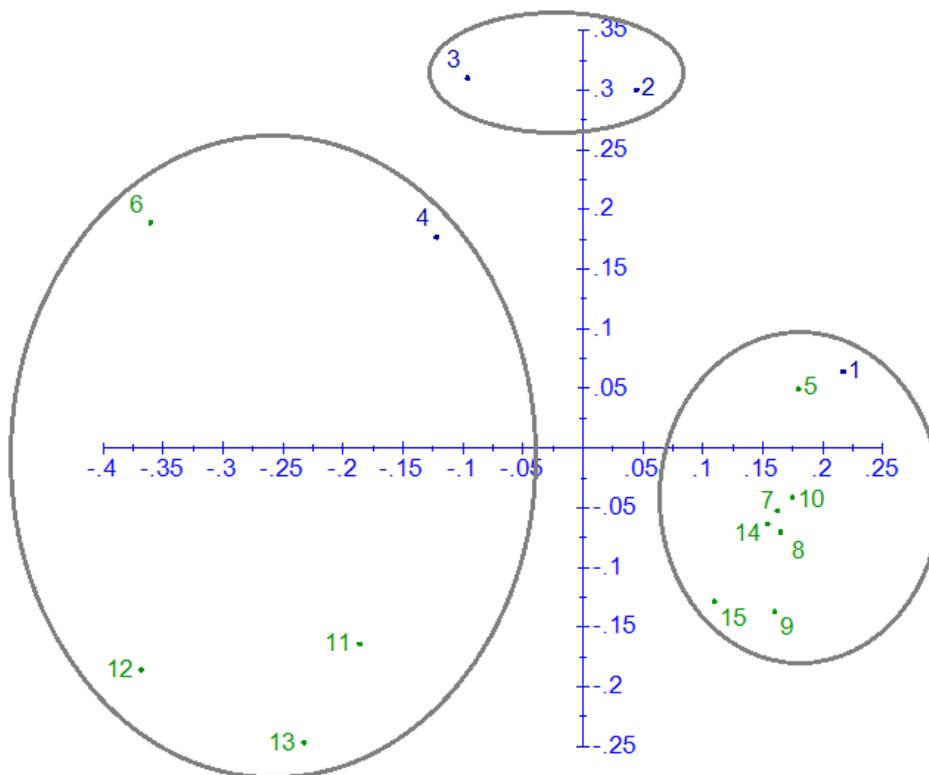
En la Tabla 8, se pudo observar que los individuos 6 y 4 mostraron un valor de disimilitud de 0.841; el más alto de todos. Este valor indicó que los individuos mencionados, se encuentran genéticamente más distantes entre ellos. El resultado es válido, tomando en cuenta que, el individuo 4 pertenece al grupo de especies de *Gypsophila sp.*, mientras que el individuo 6 es parte del grupo de híbridos comerciales de este género. Por otro lado, los individuos 5 y 7 presentan un valor de disimilitud de 0.278; el más bajo. En este caso, se muestra una alta cercanía entre estos dos individuos, lo cual es válido al tratarse de dos híbridos

comerciales del género *Gypsophila* que tienen alta probabilidad de encontrarse relacionados.

En cuanto a la relación de los demás individuos, muchos de los valores de la matriz fueron demasiado cercanos, lo que hizo más difícil su diferenciación. Como ejemplo, la relación entre los individuos 7 y 8, tuvo un valor de disimilitud de 0.392; valor muy cercano al obtenido entre los individuos 7 y 9 que fue de 0.390. Debido a la poca diferencia en algunos de estos casos, se realizó una comprobación de este análisis y se lo complemento con el método de ACP.

Los valores de la matriz generados para los individuos de este estudio, se los puede comparar y así llegar a determinar una similitud o disimilitud entre ellos, sin embargo, se concuerda con lo descrito por Defives (2017), que explica que esta matriz no facilita la representación geométrica de la disposición de los individuos, por la probabilidad de la existencia de alores cercanos entre sí.

Para corroborar, los datos obtenidos en la matriz de disimilitud, se utilizó el análisis de coordenadas principales (ACP), incluidas en el software *DARwin 6*. Este análisis permitió encontrar y visualizar los datos de la matriz de disimilitud, de manera que fue más fácil interpretar los resultados. Se obtuvo una gráfica donde las 15 muestras se agruparon según el tamaño de variación correspondiente a cada cuadrante. (Figura 9)

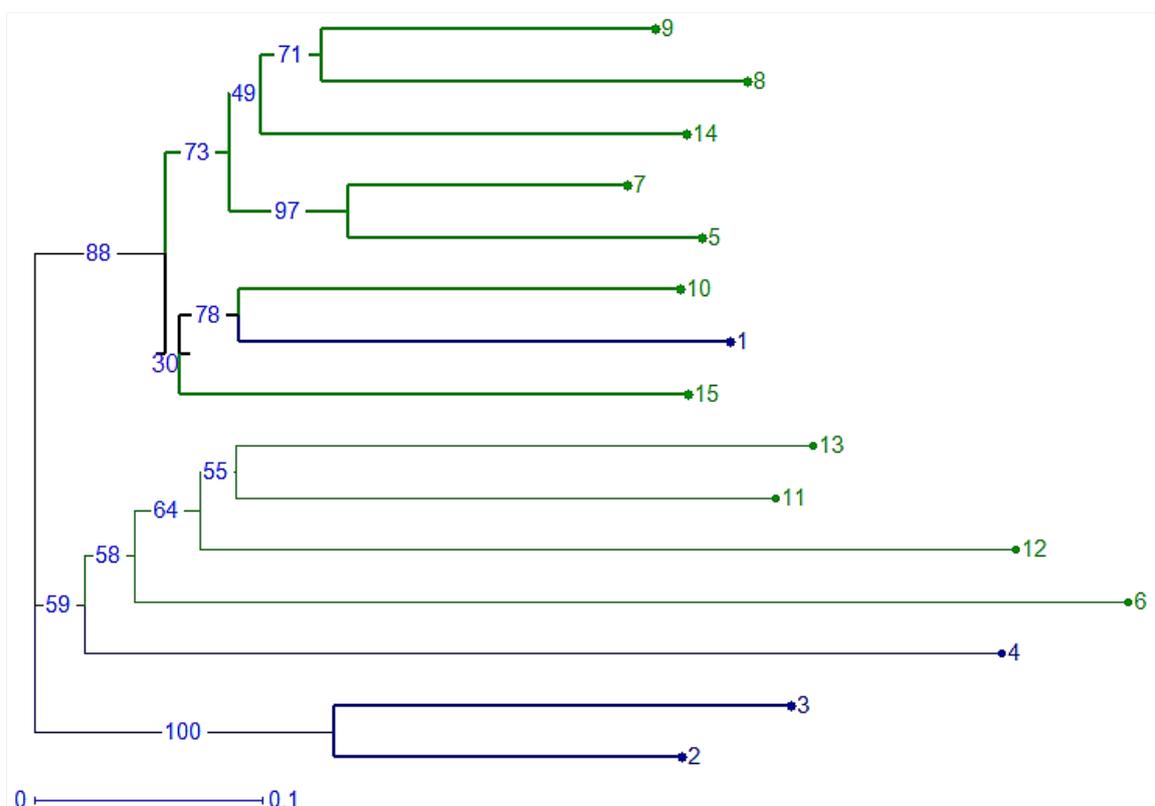


**Figura 9.** Análisis de coordenadas principales (ACP) basada en las distancias genéticas de las 15 muestras de *Gypsophila sp.*, generado por el Software de análisis DARWIN 6.

La grafica de análisis de coordenadas principales (ACP) mostró que los individuos 1, 2, 3 y 4, pertenecientes al grupo de especies, poseen un mayor distanciamiento genético entre ellas. Este resultado se justifica ya que por naturaleza, las especies poseen más variabilidad entre ellas y por tanto un mayor distanciamiento genético, como ya se ha observado en estudios de distanciamiento genético anteriormente realizados en *Gypsophila* (Martiez Nieto, et al., 2013). Asimismo se observó la tendencia de agrupación de los híbridos comerciales. Uno en un primer grupo, entre los individuos 4, 6, 11, 12 y 13, y otro formado entre los individuos, 1, 5, 7, 8, 9, 10, 14 y 15, como se muestra en la figura 11. Con esto se demostró la cercanía existente entre los integrantes de estas agrupaciones, que permitió tener una mejor visualización de la estructura

de híbridos comerciales y especies de este banco de germoplasma de *Gypsophila sp.*

Como resultado final se obtuvo un dendrograma, mediante el algoritmo *Neighbor joining*, incluida en el software *DARwin 6*. Mediante este método se pudo encontrar la longitud las ramas rama en cada agrupación de individuos, generando una gráfica en forma de un árbol (Saitou & Nei, 1987). El software generó la gráfica del dendrograma jerárquico horizontal de las 15 muestras estudiadas de *Gypsophila sp.* (Figura 10).



**Figura 10.** Dendrograma generado por el Software de análisis DARwin6, con el algoritmo *Neighbor joining* basado en el índice de similitud de *Jaccard*. Se observan las dos agrupaciones formadas

A pesar de investigar sobre una población en la que se esperaba niveles de diversidad bajos, por el hecho de pertenecer a un banco de germoplasma estrechamente relacionado; se observó claramente, tanto en el ACP como en el

dendrograma, la formación de dos agrupaciones bien definidas entre los individuos (Martínez Nieto, et. al., 2013). En el caso las muestras 2 y 3, el dendrograma reportó una relación muy cercana entre estas dos especies, lo que fue confirmado con la información confidencial proporcionada por la empresa. Además, en el estudio de disimilitud de estas dos especies se confirmó su parentesco muy estrecho ya que su valor de disimilitud fue muy bajo (Tabla 8). Por otro lado en el ACP y en el dendrograma, se observó que estos individuos se comportaron como un grupo externo, lo que indicó que están menos relacionadas con las demás especies e híbridos comerciales del estudio.

En otra de las agrupaciones, se observó la cercanía entre los híbridos comerciales 11, 12, 13 y 6, y la especie 4, lo que mostró que esta especie tiene particular cercanía con los híbridos comerciales de este grupo. Finalmente, una última agrupación mostró la relación entre los híbridos comerciales 5, 7, 8, 9, 10, 14 y 15, y la especie 1. Este resultado dejó ver cuán relacionados están las especies en la creación de híbridos comerciales y la estrecha variación que existe entre híbridos (Vettori, et al., 2013). El resultado se basaría en información antes mencionada sobre la esterilidad masculina en la gran mayoría de híbridos comerciales de *Gypsophila*, lo cual es un limitante en la elaboración de cruces. Es por ello que se utilizan especies silvestres que aporten con la fertilidad como lo menciona Vettori et al., (2013). Las agrupaciones resultantes muestran una clara participación de ciertas especies del género *Gypsophila sp.* para obtención de híbridos comerciales, y con la cual se pueden obtener mejores resultados en los programas de cruces. Como lo menciona Paladines & Quiñonez (2010), son muy pocos los cruces que llegan a producir frutos viables que generen un individuo, debido a las características agronómicas y morfológicas de las plantas de este género. Esto sumado a que la mayoría de los híbridos obtenidos, presentan esterilidad masculina lo que disminuye aún más la posibilidad de obtención de un individuo. Es por ello que podemos afirmar que, cada grupo posee una especie que facilita la creación de nuevos cruces.

A lo largo de años, el mejoramiento de *Gypsophila sp.* ha demostrado ser un procedimiento difícil de conseguir debido las características propias de la flor. Apenas un 0.1% de los genotipos creados llega a tener éxito en su selección. Es por esta razón que los híbridos comerciales exitosos son tan escasos. Al final son muy pocos los individuos con buenas características que son utilizados para la producción de nuevas variedades. La alta esterilidad de los híbridos no permite que sean utilizados en cruces y por ende que no exista una variabilidad genética muy amplia. Es por esto que se ha optado por realizar diversas de técnicas de polinización, con el fin de aumentar la probabilidad de obtener nuevos individuos. Se han utilizado métodos manuales, libres y con ayuda de insectos, de las cuales los dos últimos han tenido mejor resultado, ya que al ser una flor tan delicada requiere de la menor manipulación posible. (Paladines & Quiñonez, 2010) A pesar utilizar estas técnicas, la gran mayoría de polinizaciones jamás llega a tener fruto, por lo que conseguir un resultado positivo resulta ser un logro.

La información previa conocida sobre el género *Gypsophila* ha ayudado a corroborar y esclarecer los resultados obtenidos en este proyecto. Y con esto podemos afirmar que la técnica molecular de AFLPs con marcaje fluorescente, resulto ser exitosa para su aplicación en este género. A pesar de ser una técnica que ha sido utilizada por primera vez en cultivos de *Gypsophila* en el Ecuador, se pudo observar tan buenos resultados como los observados en estudios como el de Calistri et al., (2015) y Martiez Nieto et al., (2013). La escasa variación genética que se encontró en los 15 individuos del banco de germoplasma, no fue obstáculo para el análisis de los datos, gracias a esta metodología a pesar del estrecho distanciamiento entre los individuos, si se logró visualizar una estructura que los relacionaba.

## 6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 6.1 Conclusiones

La técnica de AFLP con marcaje fluorescente mostro ser efectiva ya que se consiguió amplificar bandas polimórficas en una porción larga de ADN. Sin embargo, el porcentaje de polimorfismos no fue considerado alto y el número de bandas totales y polimórficas fue relativamente bajo en comparación con otras técnicas de marcaje molecular ya empleadas anteriormente en este cultivo.

La realización de pruebas mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.5%, en los pasos de pre-amplificación y amplificación selectiva, permite tener un resultado preliminar que indica la unión de los cebadores a la secuencia deseada, lo que fue un paso clave para continuar con la optimización la técnica de AFLP ya que confirma la unión de los cebadores específicos, antes del envío de las muestras para el análisis de fragmentos.

La combinación de cebadores 6 resulto ser la más informativa de todas las combinaciones utilizadas inicialmente. Y con la cual, se pudo certificar buenos resultados en cuanto número de bandas y buena resolución de las mismas.

Se pudo tener una clasificación de los híbridos comerciales y especies mediante los valores de disimilitud obtenidos en el software *DARwin 6*. Se pudo ver que las especies se encuentran más distantes entre sí, debido a la diversidad propia de su naturaleza silvestre. Mientras que los híbridos comerciales tienden a formar agrupaciones más cercanas entre ellos, probablemente por la utilización de los mismos parentales debido a los limitados genotipos fértiles masculinos que pueden utilizarse.

Por otro lado en el dendrograma se puede ver que dos de las especies estudiadas tienen una relación muy cercana a los híbridos comerciales,

probablemente algún parentesco proveniente los múltiples cruces de los que se originan. Sugiriendo que son las especies de mayor uso en programas de cruces.

## 6.2 Recomendaciones

Se recomienda que en técnica de extracción de ADN por el método de CTAB, se utilice adicionalmente un método de purificación de ADN, de manera que se garantice la calidad del material genético y se disminuya posibles errores del proceso. Por otro lado, si bien el método de CTAB proporciona una buena cantidad de material genético utilizando poca cantidad de material vegetal, también se podría pensar en utilizar otras técnicas de extracción que proporcione material genético de mejor calidad, con la necesidad de aumentar la cantidad de material vegetal para obtener mayores concentraciones.

Se debe realizar un número mayor de combinaciones, de manera que se pueda abarcar más partes del genoma y así encontrar combinaciones de cebadores mucho más informativos para este cultivo. Tomando en cuenta que en *Gypsophila sp.* es muy poca la información que se tiene de combinaciones altamente informativas.

Se podía realizar este procedimiento en un mayor número de platas de manera para obtener más información de distancias y variabilidad genética que se posee en un banco de germoplasma de *Gypsophila sp.*, de este modo se puede comparar sus parentescos.

Para confirmar los resultados se recomienda realizar una repetición para cada individuo de modo que se descarte posibles errores que pudieron haber surgido durante el procedimiento. Como por ejemplo en la toma de muestras, en protocolo de laboratorio aplicado, en el transporte de las muestras para la secuenciación, entre otros.

## REFERENCIAS

- Badii, M., Castillo, J., Wong, A., & Landeros, J. (2006). Precisión de los índices estadísticas: Técnicas de jackknife & bootstrap. *Inovaciones de Negocios*, 4(1), 63-78.
- Barcaccia, G. (2009). *Molecular Markers for Characterizing and Conserving Crop Plant Germplasm*. *Molecular Techniques in Crop Improvement*, 231-254. doi:10.1007/978-90-481-2967-6\_10
- Blacket M., Robin C., Good R., & Miller A., (2012), *Universal primers for fluorescent labelling of PCR fragments - an efficient and cost-effective approach to genotyping by fluorescence*. *Molecular Ecology Resources*, 12, 456-463. doi: 10.1111/j1755-0998.2011.03104.x
- Calistri, E., Buiatti, M., & Bogani, P. (2015). *Characterization of Gypsophila sp. species and commercial hybrids with nuclear whole-genome and cytoplasmic molecular markers*. *Plant Biosystems*. doi:10.1080/11263504.2014.944609
- Carr, G. D. (22 de Enero de 2006). *University of Hawaii - Botany Department*. Recuperado de <http://www.botany.hawaii.edu/faculty/carr/caryophyll.htm>
- CDFA. (2015). *Gypsophila panniculata*. CALIFORNIA DEPARTMENT OF FOOD AND AGRICULTURE. Recuperado de *Gypsophila sp. genus*: [https://www.cdfa.ca.gov/plant/ipc/encycloweedia/weedinfo/Gypsophila sp.-paniculata.htm](https://www.cdfa.ca.gov/plant/ipc/encycloweedia/weedinfo/Gypsophila%20sp.-paniculata.htm)
- Danzinger. (2017). *Gypsophila*. Danzinger - "Dan" Flower Farm. Recuperado de *Culture Description*: <http://www.danzinger.co.il/files/d0cc38ced399f003cc9a75d772c0e1cc.pdf>
- Darwent, A. L., & Coupland, R. T. (1966). *Life History of Gypsophila sp. panniculata*. *Weeds*. doi:10.2307/4040974.

- Defives, G. (2017). Analisis de tabas de disimilitudes. *Revista Económica*(10).
- Doyle, J. 1987. A rapid ADN isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull.* 19: 11–15.
- FAO. (2014). Normas para bancos de germoplasma de recursos fitogenéticos para la alimentación y la agricultura. 45-48. Recuperado de <http://www.fao.org/3/a-i3704s.pdf>
- Galindo Tovar, M., Gasperin Sanatta, J., Alejandro Rosas, J., Leyva Ovalle, O., Murguía González, J., Lee Espinosa, H., & Landero-Torres, I. (2014). *Comparison of four DNA extraction methods on various tissues and types of *Sechium edul.** *International Journal of Experimental Botany*, 307-310. Recuperado de <http://www.revistaphyton.fundromuloraggio.org.ar/vol83/GalindoTovar.pdf>
- Hasbún, R., Iturra, C., & Moraga, P. (2012). *An efficient and reproducible protocol for production of AFLP markers in tree genomes using fluorescent capillary detection.* SpringerLink, 925-931. doi:10.1007/s11295-011-0463-6
- Hills, P., & van Staden, J. (2002). *An improved DNA extraction procedure for plant tissues with a high.* *South African Journal of Botany*, 549-550.
- Holland, B., Clarke, A., & Meudt, H. (2008). *Optimizing Automated AFLP Scoring Parameters to Improve Phylogenetic Resolution.* Society of Systematic Biologists. doi:10.1080/10635150802044037
- Jorge, A., & Hanson, J. (2017). *Bioversity International research for development in agricultural and tree biodiversity.* Recuperado de <http://cropgenebank.sgrp.cgiar.org/index.php/procedures-mainmenu-242/characterization-mainmenu-205>
- Korkmaz, M., & Dogan, N. Y. (2015). *Biogeographic pattern of genetic diversity detected by RAPD and ISSR analysis in *Gypsophila sp.* (Caryophyllaceae) species from Turkey.* (3), 14. Erzincan, Turkey. doi:<http://dx.doi.org/10.4238/2015.August.3.6>
- Lauer, H., & Rozing, G. (2014). *High Performance Capillary Electrophoresis. Germany: Agilent Technologies.*

- Martiez Nieto, M., Segarra Moragues, J. G., Merlo, E., Martinez Fernandez, F., & Mota, J. F. (Febrero de 2013). *Genetic diversity, genetic structure and phylogeography of the Iberian endemic Gypsophila sp. struthium (Caryophyllaceae) as revealed by AFLP and plastid DNA sequences: connecting habitat fragmentation and diversification.* (173), 654-675. España.
- Merkel, A. (2012). *Climate data.* Recuperado de <https://es.climate-data.org/location/25451/>
- Moose, S., & Humm, R. (2008). *Molecular Plant Breeding as the Foundation for 21st Century Crop Improvement.* Plant Physiology, 147, 969-977. doi:10.1104/pp.108.118232
- Moyal Ben Zvi, M., Zuker, A., Ovadis, M., Shklarman, E., Ben-Meir, H., & Zenvirt, S. (2008). *Agrobacterium-mediated transformation of Gypsophila sp. (Gypsophila sp. paniculata L.).* Mol Breeding, 22, 543-553.
- Muller, U., & Wolfenbarger, L. (1999). *AFLP genotyping and fingerprinting.* Elsevier Science, 14(10), 389-393.
- Paladines, R., & Quiñones, A. (2010). *Reseña de la creacion de la variedad de Gypsophila sp. Over Time. Ecuador y sus flores,* 28, 38-40. Recuperado de <https://issuu.com/nmoreno81/docs/revista-eyf-28>
- Perrier, X., & Jacquemoud-Collet, J.-P. (2006). *DARwin software.* Recuperado de <http://darwin.cirad.fr/>
- Pringle, J. S. (2017). *Flora of North America.* Recuperado de [http://www.efloras.org/florataxon.aspx?flora\\_id=1&taxon\\_id=114363](http://www.efloras.org/florataxon.aspx?flora_id=1&taxon_id=114363)
- ProEcuador. (2013). *Análisis sectorial de flores.* Recuperado de [http://www.proecuador.gob.ec/wp-content/uploads/2013/07/PROEC\\_AS2013\\_FLORES.pdf](http://www.proecuador.gob.ec/wp-content/uploads/2013/07/PROEC_AS2013_FLORES.pdf)
- ProEcuador. (2016). *Sector Analysis - Summer Flowers. Ecuador.* Recuperado de [http://www.proecuador.gob.ec/wp-content/uploads/2016/09/PROEC\\_SA2015\\_SUMMER\\_FLOWERS.pdf](http://www.proecuador.gob.ec/wp-content/uploads/2016/09/PROEC_SA2015_SUMMER_FLOWERS.pdf)

- Promega. (2017). *Wizard Genomic DNA Purification Kit*. Recuperado de <https://worldwide.promega.com/products/dna-purification-quantitation/genomic-dna-purification/wizard-genomic-dna-purification-kit/>
- Rady, M. R. (2006). *In vitro culture of Gypsophila sp. paniculata L. and random amplified polymorphic DNA analysis of the propagated plants*. Biol Plant, 50(4), 507. doi:doi:10.1007/s10535-006-0080-7
- Saitou, N., & Nei, M. (1987). *The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees*. Molecular biology and evolution, 406-425.
- Schuelke, M. (2000). *An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments*. NATURE BIOTECHNOLOGY, 18, 233-234. doi:10.1038/72708
- Socias i Company, R., Rubio Cabetas, M., Garcés Claver, A., Mallor, C., & Alvarez, M. J. (2014.). *La obtención de variedades: desde la mejora clásica hasta la mejora genética molecular*. 11. Recuperado de <http://chil.me//download-doc/131925>
- Stölting, K., Clarke, A., Meudt, H., Blankhorn, W., & Wilson, A. (2011). *Cost-effective fluorescent amplified fragment length polymorphism (AFLP) analyses using a three primer system*. Molecular Ecology Resources, 494-502. doi:10.1111/j.1755-0998.2010.02957.x
- The Plant List. (2013). *The Plant List- A working list of all plant species*. Recuperado de [http://www.theplantlist.org/tpl1.1/search?q=Gypsophila sp](http://www.theplantlist.org/tpl1.1/search?q=Gypsophila+sp)
- Thermo Scientific. (2017). *Interpretation of Nucleic Acid 260/280 Ratios*. Recuperado de <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/T123-NanoDrop-Lite-Interpretation-of-Nucleic-Acid-260-280-Ratios.pdf>
- USDA. (2017). *Classification for Kingdom Plantae Down to Genus Gypsophila sp. L.* United States Department of Agriculture - Plants Database. Recuperado de

<https://plants.usda.gov/java/ClassificationServlet?source=profile&symbol=GYPPO&display=63#>

- Vettori, L., Schiff, S., Tani, C., Pasqualetto, P., & Bennici, A. (12 de Julio de 2013). *Morphological and cytological observations of wild species and hybrids of Gypsophila sp.* (T. & Francis, Ed.) Plant Biosystems- An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology: Official Journal of the Societa Botanica Italiana. doi:10.1080/11263504.2013.824041
- Vos, P., Hogers, R., & Bleeker, M. (1995). *AFLP: a new technique for DNA fingerprinting*. Nucleic Acids Research, 23(21), 4407-4414. doi: <https://doi.org/10.1093/nar/23.21.4407>
- Vuytsteke, M., Peleman, J., & van Eijk, M. (2007). *AFLP technology for DNA fingerprinting*. Nature Protocols, 2(6). doi:10.1038/nprot.2007.175

