

ANÁLISIS DE DIVERSIDAD GENÉTICA EN *Ziziphus mistol* GRISEB. MEDIANTE MARCADORES MOLECULARES ISSR

TOMAS, P. A.¹; ZIETZ, R.¹ & CERINO, M. C.^{1,2}

RESUMEN

Se analizó la diversidad genética en una población de *Ziziphus mistol* mediante el uso de marcadores moleculares ISSR. Se utilizaron siete *primers* para caracterizar 31 genotipos correspondientes a 10 árboles parentales y sus progenies. La proporción de *loci* polimórficos y los niveles de diversidad genética observados fueron bajos; sin embargo, todos los genotipos se diferenciaron en el dendrograma obtenido a partir de las distancias genéticas. Mediante AMOVA se determinó que la mayor proporción de la variabilidad genética existente se registró dentro de las progenies. El análisis de bandas paternas permitió determinar el origen por cruzamiento de todos los genotipos obtenidos de semilla, demostrando la eficacia de los mecanismos que favorecen la alogamia en la especie. Se discuten las posibles implicancias de la reducida diversidad observada y la necesidad de ampliar el análisis a otras poblaciones, con el fin de elaborar e implementar medidas eficientes de conservación y aprovechamiento de este recurso fitogenético.

Palabras clave: *Ziziphus mistol*, diversidad genética, ISSR, *Rhamnaceae*, recursos genéticos.

ABSTRACT

Analysis of genetic diversity in *Ziziphus mistol* by molecular markers ISSR.

The genetic diversity in a population of *Ziziphus mistol* was analysed using molecular markers. The DNA polymorphism among 31 genotypes obtained from 10 parental trees was assessed using seven inter simple sequence repeat (ISSR) *primers*. The analysed population showed low percentage of polymorphic bands and low genetic diversity. However, all genotypes were different in cluster analysis based on genetic distances. The molecular variance analysis (AMOVA) showed a

1.- Facultad de Ciencias Agrarias, UNL. 86-Kreder 2805. (3080HOF) Esperanza, provincia de Santa Fe. Telefax +54 (3496) 426400. Email: patomas@fca.unl.edu.ar

2.- Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas.

Manuscrito recibido el 6 de marzo de 2017 y aceptado para su publicación el 3 de mayo de 2017.

higher proportion of variance explained within progenies. Paternal amplicons allowed to determine the cross-fertilizing origin for all progenies analysed. These results confirm the efficacy of the mechanisms favoring allogamy in this species. Possible implications of low genetic diversity in this population and the need to extend the analysis to other populations are discussed in order to elaborate and implement management strategies for conservation and use of this genetic resource.

Key words: *Ziziphus mistol*, genetic diversity, ISSR, Rhamnaceae, genetic resources

INTRODUCCIÓN

El género *Ziziphus* Mill. (Rhamnaceae) comprende unas 170 especies de árboles y arbustos de distribución pantropical (21), de las cuales 25 son nativas de América y el Caribe y conforman el clado del Nuevo Mundo (10). *Ziziphus mistol* Griseb. ($2n = 2x = 22$), vulgarmente denominado “mistol”, es una de las especies del género más ampliamente distribuidas en el continente americano, constituyendo un componente característico de los ambientes salinos del bosque Chaqueño de las provincias del centro y norte de Argentina (26). La misma posee importancia como frutal nativo y es actualmente objeto de estudio como recurso forestal no maderero de la Provincia de Santa Fe dentro del Programa de Documentación, Conservación y Valoración de la Flora Nativa (ProDoCoVa-UNL). El principal uso de sus frutos es como alimento para las personas y forraje para el ganado. Además, diferentes estudios demostraron la potencialidad para la utilización de su extracto en tratamientos medicinales (18). En este sentido, para potenciar su aprovechamiento como recurso genético resulta indispensable conocer los factores que condicionan el éxito reproductivo de esta especie, como ser el modo de reproducción y los niveles de diversidad genética de las poblaciones. Estudios sobre el comportamiento reproductivo de *Z. mis-*

tol demostraron que la misma es una especie predominantemente alógama dependiente de vectores de polen para el establecimiento de frutos y semillas (5). Sus flores exhiben dicogamia protándrica sincronizada a nivel de individuo como mecanismo para prevenir la auto-polinización autónoma, además de un sistema de auto-incompatibilidad común a las demás especies del género (5). Ambos mecanismos actuarían en forma complementaria para evitar la geitonogamia y la consecuente depresión por endogamia.

En especies alógamas auto-incompatibles, la variabilidad genética a nivel poblacional constituye un factor de singular importancia para el éxito reproductivo, debido a que la posibilidad de un genotipo de recibir polen compatible está asociada con el nivel de endogamia de la población (12). Esta situación es aun más relevante en poblaciones silvestres que sufren reducción de su tamaño poblacional por fragmentación de hábitat, donde las poblaciones remanentes representan sólo un subconjunto de la reserva genética pre-fragmentación (27). En este sentido, fue demostrado que el éxito reproductivo de especies auto-incompatibles es afectado negativa y significativamente por dicho fenómeno (1). Dado que las poblaciones silvestres de *Z. mistol* suelen verse afectadas por la reducción del área de bosques nativos, los niveles de diversidad genética podrían condicionar el éxito reproductivo en poblacio-

nes pequeñas. Por ello, la estimación de la diversidad existente sería un indicador de la potencialidad productiva en una población.

Actualmente, la mayoría de los estudios que buscan analizar la diversidad genética se basan en el estudio de marcadores moleculares de ADN, los cuales permiten una precisa caracterización genotípica, superando las limitaciones que se presentan con el empleo de marcadores morfológicos y bioquímicos (4, 8, 20). En particular, los marcadores ISSRs (regiones entre secuencias simples repetidas o inter-microsatélites) presentan las ventajas de no requerir información previa de los materiales a analizar, presentando alta repetibilidad, análisis multi-locus y sencillez técnica de realización (17, 19). Marcadores de este tipo fueron exitosamente empleados en el análisis de la variación genética entre germoplasma de varias especies de *Ziziphus* (2, 11, 13, 22, 23, 24). En este sentido, el objetivo del presente trabajo fue analizar la diversidad genética en una población de *Ziziphus mistol* del centro-norte de Santa Fe mediante marcadores ISSR.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Los individuos analizados fueron procedentes de una población silvestre de *Z. mistol* ubicada en la Estancia 'El Matrero II' (30° 51' 09" S, 60° 15' 56" W), Colonia La Brava, Departamento San Javier, Provincia de Santa Fe, Argentina. Se analizaron en total 31 genotipos, correspondientes a 10 árboles parentales adultos y 21 plántulas obtenidas de semillas cosechadas de dichos árboles parentales en su ambiente natural durante el verano 2014-2015. Los 10 árboles parentales fueron seleccionados

distanciados dentro del ambiente natural para una mejor representatividad de la población y denominados con "P" (parental) seguido de un número de individuo (P01 a P10). Para cada árbol parental se tomaron muestras de hojas jóvenes, las que fueron desecadas y conservadas con sílica gel hasta la extracción de ADN y se recolectaron frutos para obtener semillas de esa temporada de floración. La germinación de las semillas se realizó en placas de petri, sobre papel de filtro humedecido con agua destilada y a una temperatura de 25°C constante durante 15 días. Luego las plántulas fueron trasplantadas en macetas de 400 cm³ en cámara de crecimiento hasta la toma de muestras. Cada plántula fue identificada con el número del parental correspondiente. El número de plántulas analizadas por parental varió entre 1 y 6, dependiendo de la disponibilidad de semillas viables y de plántulas logradas.

Marcadores ISSR

La extracción de ADN genómico total se realizó a partir de 500 mg de hojas jóvenes, utilizando hojas secas o frescas para los parentales y las plántulas, respectivamente, mediante protocolo con CTAB (7). Luego de la extracción, las muestras fueron tratadas con ARNasa (10 µg/ml de concentración final) y el ADN fue resuspendido en Tris-HCl 10 mM pH 8 y almacenado a -20 °C hasta su uso.

Se realizó una amplificación preliminar para 38 *primers* ISSRs en seis genotipos tomados al azar, seleccionando aquellos *primers* que presentaron polimorfismos y un patrón de bandas analizables y repetibles. Se seleccionaron así siete *primers* que fueron empleados para el análisis de la totalidad de las muestras (Tabla 1). La mezcla de reacción consistió de: 25 ng de ADN, 0,2

mM de dNTPs, 2 mM de MgCl₂, 0,5 μM de *primer* y 1 U de Taq ADN polimerasa en un volumen final de 20 μl. Las ampliificaciones se llevaron a cabo en un termociclador Techne TC-312, y consistió de un primer paso de 2 minutos a 94 °C, seguido de 39 ciclos de 45 segundos a 94 °C, 45 segundos a la temperatura de hibridación o *annealing* (T_m) del primer correspondiente y 90 segundos a 72 °C, concluyendo con una extensión final de 7 minutos a 72 °C. En cada ensayo de amplificación se incluyó un control negativo o blanco sin ADN para verificar la ausencia de contaminación.

Los productos de amplificación fueron separados por tamaño mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa 1,2 % en *buffer* TBE 0,5X durante 3 horas a 75 V constantes, incluyendo en cada gel un marcador de peso molecular (100 bp DNA Ladder, Fermentas) para estimar el tamaño de los amplicones. Los fragmentos fueron visualizados por tinción con colorante fluorescente específico (GelRed, Genbiotech). La observación de los patrones de bandas y su fotografiado se realizó en un transiluminador UV, para su posterior análisis en imágenes digitalizadas.

Análisis de datos

Los fragmentos fueron registrados como presencia (1) y ausencia (0) en cada genotipo. Para cada primer se determinó el porcentaje de bandas polimórficas y el índice de contenido de información polimórfica (PIC, *polymorphic information content*). Se estimaron las distancias genéticas (D) entre genotipos utilizando el coeficiente de similitud Jaccard, tomando como $D = \sqrt{1-S}$, y se realizó un análisis de agrupamiento mediante algoritmo de ligamiento promedio (UPGMA), generándose el dendrograma correspondiente. Para determinar

la proporción de la variación existente entre y dentro de las familias de medios hermanos (progenies) se realizó un análisis de la varianza molecular (AMOVA) con 1000 permutaciones y se estimó el valor de diversidad genética de Nei o Heterocigocidad esperada (16). Para la verificación de origen por cruzamiento en cada plántula de cada progenie analizada se registraron las bandas de origen paterno, tomando como tales aquellas presentes en cada individuo obtenido de semilla y además ausentes en el genotipo parental materno correspondiente. Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software INFOGEN (3).

RESULTADOS

Los siete *primers* ISSR seleccionados mediante el test inicial generaron 39 bandas totales, de las cuales el 46,1 % resultaron ser polimórficas. El valor PIC fue variable entre *primers*, con un rango de 0,145 a 0,332 (Tabla 1).

En el análisis de agrupamiento basado en distancias genéticas todos los individuos se diferenciaron en el dendrograma, sin observarse agrupamientos definidos entre las plántulas y su genotipo parental (Figura 1). Todos los parentales se diferenciaron por encima del 50 % de la distancia máxima estimada, con un rango entre 0,29 (P5-P7) y 0,53 (P1-P9). Solamente algunos genotipos descendientes del parental P5 se agruparon por progenie y a distancias intermedias (distancia 0,20 entre 5-1 y 5-3, y 0,24 entre 5-1 y 5-4).

En el AMOVA, la mayor proporción de la diversidad genética se registró dentro de las progenies de medios hermanos, en coincidencia con lo observado en el dendrograma

Tabla 1: Información de secuencia, número de fragmentos amplificados y proporción de polimorfismos para cada primer ISSR utilizado en los genotipos analizados de *Z. mistol*.

Primers ISSR	Secuencia (5'-3') ^(*)	Tm (°C)	Bandas		% Polimórficas	PIC
			Polimórficas	Totales		
UBC820	(GT) ⁸ C	45	2	5	40	0,287
UBC825	(AC) ⁸ T	51	5	5	100	0,332
UBC834	(AG) ⁸ YT	55	2	7	29	0,145
UBC841	(GA) ⁸ YC	45	2	7	29	0,329
UBC845	(CT) ⁸ RG	45	3	5	60	0,290
UBC846	(CA) ⁸ RT	49	2	4	50	0,186
UBC858	(TG) ⁸ RT	50	2	6	33	0,263
Total Promedio			18 2,6	39 5,6	- 46,1	- 0,262

(*) Y = pirimidina (C o T); R = purina (A o G)

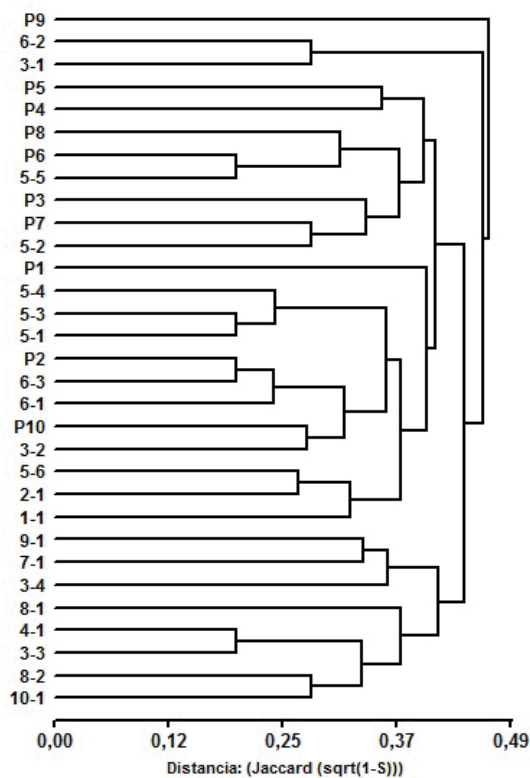


Figura 1: Dendrograma de los genotipos analizados en base a la distancia genética estimada sobre el índice de Jaccard y utilizando el algoritmo UPGMA. Los individuos identificados con P corresponden a los árboles parentales. Los individuos restantes se identifican inicialmente por el número de parental, seguido por del número de genotipo, separados por guión.

Tabla 2: Resultado del AMOVA entre y dentro de las progenies de *Z. mistol* analizadas.

Fuente de Variación	S. C.	g.l.	Valor p	Estimación de la varianza	% de la Varianza	Phi-ST
Entre progenies	1,64	9	< 0,0001	0,04	26,36	0,26
Dentro de progenies	1,18	11	0	0,11	73,64	-
Total	2,82	20	-	0,15	100	

Tabla 3: Registro de bandas paternas por primer ISSR y por genotipo en las progenies analizadas de *Z. mistol*.

Progenie	Primer ISSR							Total por genotipo
	UBC820	UBC825	UBC834	UBC841	UBC845	UBC846	UBC858	
1-1	1	1	1	1	0	1	0	5
2-1	0	2	0	0	1	1	1	5
3-1	1	1	0	2	0	0	0	4
3-2	1	1	0	2	1	1	0	6
3-3	0	1	0	2	0	1	0	4
3-4	1	1	0	1	1	0	0	4
4-1	0	2	0	2	0	1	0	5
5-1	0	2	0	1	0	1	0	4
5-2	0	2	0	1	0	1	0	4
5-3	1	2	0	1	0	1	0	5
5-4	0	1	0	1	0	1	0	3
5-5	0	1	0	2	0	1	0	4
5-6	1	2	0	2	0	1	1	7
6-1	1	1	0	1	0	0	0	3
6-2	1	2	0	1	0	0	1	5
6-3	0	1	0	1	0	0	0	2
7-1	0	1	0	2	0	1	0	4
8-1	1	1	0	0	1	2	0	5
8-2	1	1	0	0	0	2	0	4
9-1	1	1	1	1	0	1	0	5
10-1	1	1	0	0	1	0	0	3
Promedio	0,6	1,3	0,1	1,1	0,2	0,8	0,1	4,3

ma, si bien entre progenies se observó un grado de diferenciación moderado (Tabla 2). Por otro lado, la diversidad genética estimada de Nei para la población alcanzó un valor de 0,167.

El registro de bandas paternas (ausentes en el genotipo parental materno pero presentes en su progenie) fue variable entre primers y entre genotipos, siendo más elevado en aquellos primers con mayor valor de PIC. Este resultado permitió determinar el origen por cruzamiento de la totalidad de las progenies analizadas, corroborando la eficacia de los mecanismos de prevención de la auto-polinización presente en la especie (Tabla 3).

DISCUSION

El uso de marcadores ISSR ha sido una herramienta ampliamente utilizada para el análisis de la diversidad genética en el género *Ziziphus*. Estudios realizados en poblaciones y cultivares de *Z. mauritiana* Lam. y *Z. nummularia* Lam. utilizando marcadores ISSR reportan, en promedio, 10 fragmentos amplificados por primer, de los cuales alrededor del 90% resultaron polimórficos, y mencionan valores de PIC mayores a 0,3 (22, 23, 24). El presente estudio representa el primer antecedente de análisis molecular de la variabilidad genética en *Z. mistol*. En general, la población aquí analizada presentó niveles de variabilidad genética menores a lo esperado en comparación con otros estudios existentes para especies de *Ziziphus* donde, mediante el empleo de marcadores ISSR, se registraron porcentajes de loci polimórficos entre el 60% y 90% e índices de diversidad genética mayores a 0,22 (2, 22, 24). Nuestros resultados indican que la población analizada de *Z. mistol* presenta ba-

jos porcentajes de polimorfismos y los distintos primers resultaron moderadamente informativos. Es posible que las diferencias de nuestros resultados con aquellos obtenidos para otras especies de *Ziziphus* sean debido a que este estudio abarca una única población de *Z. mistol*. En relación a ello, el valor de diversidad genética para la población analizada (0,167) fue semejante al reportado en el análisis de la variabilidad en *Z. spina-christi* (L.) Willd. (0,154), correspondiente a una población reproductivamente aislada (2), la cual presentó también porcentajes de bandas polimórficas similares a los aquí obtenidos. Esto sugiere que sería necesario evaluar más poblaciones de *Z. mistol* para determinar si se trata de una situación puntual o representa una condición frecuente a nivel de región o especie.

En el análisis de agrupamiento, todos los genotipos se diferenciaron en base a su distancia genética y los árboles parentales presentaron una importante diferenciación entre sí. Aunque las menores distancias genéticas se registraron entre algunos individuos descendientes del mismo parental, en la mayoría de los casos los genotipos de una misma progenie no se agruparon en el dendrograma. En el mismo sentido, en el AMOVA la mayor proporción de la variación genética se presentó dentro de las progenies, con una moderada diferenciación entre ellas. Estos resultados indicarían la existencia de importante flujo génico dentro de la población. No obstante, se considera recomendable analizar un número similar de genotipos por progenie para un mejor análisis de la estructura genética interna de la población (15), lo cual no ha sido posible en este estudio.

La eficacia reproductiva resulta comprometida en poblaciones pequeñas de especies alógamas con mecanismos para

prevenir la auto-polinización autónoma (9). Los estudios acerca de la biología reproductiva de *Z. mistol* indican que se trata de una especie predominantemente alógama con un sistema de auto-incompatibilidad parcial (5). Aunque la diferenciación observada entre progenies indica un flujo génico importante dentro de la población, la reducida diversidad existente en relación a lo esperado para una especie alógama podría acarrear un riesgo a largo plazo por endogamia si la auto-polinización es frecuente. El uso de marcadores moleculares y más específicamente la identificación de bandas paternas ha resultado útil en la verificación del origen por cruzamiento o auto-polinización en numerosas especies (6, 11, 14, 25). La utilización de bandas paternas como diagnóstico de cruzamiento no se encuentra limitado en el caso de polinización libre, requiriendo solamente contar con suficiente nivel de polimorfismos en la población para evitar falsos negativos. En este estudio, el registro de bandas paternas en el conjunto de *primers* empleados ha permitido determinar que todas las progenies analizadas son producto de cruzamientos. Estudios previos demostraron que, aunque para *Z. mistol* se ha observado establecimiento de frutos y semillas en condiciones de auto-polinización forzada, la especie presenta un sistema de auto-incompatibilidad por el cual la autopolinización autónoma no ocurre naturalmente y el polen propio presenta crecimiento deficiente sobre el estigma del mismo genotipo (5). Nuestros resultados sugieren que el sistema de auto-incompatibilidad de esta especie sería eficiente en la prevención de la auto-polinización en la población bajo estudio. Por ello, una eventual limitación en el éxito reproductivo estaría asociado en mayor medida a una reducida

variabilidad para los alelos de auto-incompatibilidad relacionada con la baja diversidad genética de la población, más que a depresión por endogamia. No obstante, dado que la auto-incompatibilidad es un carácter de control genético sencillo, podrían existir diferentes valores de auto-fecundación en otras poblaciones como consecuencia de mutaciones en los genes involucrados, por lo que los resultados aquí obtenidos deben considerarse con precaución fuera de la población analizada.

En conclusión, la técnica de marcadores empleada permitió caracterizar la diversidad genética de la población analizada, y aunque se evidenció un importante flujo génico dentro de la población, los valores de polimorfismos y diversidad genética fueron bajos. Dada la amplia distribución geográfica de la especie y la diversidad de ambientes en los que se la encuentra, se plantea la necesidad de extender el estudio a otras poblaciones de *Z. mistol*, buscando alcanzar una adecuada representatividad del recurso en la región, para estimar de una manera confiable la variabilidad genética existente y su distribución entre y dentro de las poblaciones. Esta información, complementada con características del ambiente local, sería de importancia como herramienta para estimar de modo eficiente el nivel de vulnerabilidad del recurso fitogenético y planificar su aprovechamiento.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Programa de Documentación, Conservación y Valoración de la Flora Nativa (PRODOCOVA) por facilitar el acceso a los materiales estudiados y a los revisores anónimos por sus contribuciones para mejorar el manuscrito. Este estudio fue financiado por el proyecto CAI+D-UNL 501-201101-00234 y por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina.

BIBLIOGRAFÍA

- 1.- AGUILAR, A.; ASHWORTH, L.; GALLETTO, L. Y AIZEN, M. 2006. Plant reproductive susceptibility to habitat fragmentation: review and synthesis through a meta-analysis. *Ecology Letters* 9: 968-980.
- 2.- ALANSI, S.; TARROUM, M.; AL-QURAINY, F.; KHAN, S. Y NADEEM, M. 2016. Use of ISSR markers to assess the genetic diversity in wild medicinal *Ziziphus spina-christi* (L.) Willd. collected from different regions of Saudi Arabia. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* 30 (5): 942-947.
- 3.- BALZARINI M.G. Y DI RIENZO J.A. 2013. InfoGen versión 2013. FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. <http://www.info-gen.com.ar>.
- 4.- BECERRA, V. Y PAREDES, M. 2000. Use of biochemical and molecular markers in genetic diversity studies. *Agricultura Técnica* 60 (3): 270-281.
- 5.- CERINO, M.C.; RICHARD, G.A.; TORRETTA, J.P.; GUTIÉRREZ, H.F. Y PENSIERO, J.F. 2015. Reproductive biology of *Ziziphus mistol* Griseb. (Rhamnaceae), a wild fruit tree of saline environments. *Flora* 211: 18-25.
- 6.- CONCEIÇÃO, L.D.; BELO, G.O.; SOUZA, M.M.; SANTOS, S.F.; CERQUEIRA-SILVA, C.B.M. Y CORRÊA, R.X. 2011. Confirmation of cross-fertilization using molecular markers in ornamental passion flower hybrids. *Genetics and Molecular Research* 10: 47-52.
- 7.- DOYLE, J.J. Y DOYLE, J.L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13-15.
- 8.- FORSTER, J.W. Y SPANGENBERG G. 1999. Forage and turf grass biotechnology: principles, methods and prospects. En: Setlow J.K. (ed.) *Genetic Engineering: Principles and Methods*, vol 21. Kluwer Academic/ Plenum Publishers, New York, Pág 191-237.
- 9.- GUTIÉRREZ, H.F.; MEDAN, D. Y PENSIERO, J.F. 2006. Limiting factors of reproductive success in *Bromus auleticus* (Poaceae). 2. Fruit set under different pollination regimes, pollen viability, and incompatibility reactions. *New Zealand Journal of Botany* 44: 57-63.
- 10.- ISLAM, M.B. Y SIMMONS, M.P. 2006. A thorny dilemma: testing alternative intrageneric classifications within *Ziziphus* (Rhamnaceae). *Systematic Botany* 31: 826-842.
- 11.- KHAN, H.; SIVALINGAM, P.N.; CHAUHAN, S.; AWASTHI, O.P. Y MORE, T.A. 2013. Improved crossing technique and identification of true F₁ hybrids of *Ziziphus mauritiana* Lam. by molecular markers. *Scientia Horticulturae* 150: 164-171.
- 12.- LANDE, R. Y SCHEMSKE, D. W. 1985. The evolution of self-fertilization and inbreeding depression in plants. I. Genetic models. *Evolution* 39: 24-40.
- 13.- LI, J.D.; BI, H.T.; LI, H.T.; LI, Z.S. Y FENG, J.C. 2009. Genetic analysis of *Ziziphus jujuba* "Huizao" using issr markers. *Acta Hort.* 840: 135-142.

- 14.- LIN, X.C.; LOU, Y.F.; LIU, J.; PENG, J.S.; LIAO, G. L. Y FANG, W. 2010. Crossbreeding of *Phyllostachys* species (Poaceae) and identification of their hybrids using ISSR markers. *Genetics and Molecular Research* 9: 1398-1404.
- 15.- MOSTACEDO, B. Y FREDERICKSEN, T.S. 2000. Manual de métodos básicos de muestreo y análisis en ecología vegetal. Editorial El País. Proyecto de Manejo Forestal Sostenible (BOLFORS), Santa Cruz. 87p.
- 16.- NEI, M. 1987. Molecular evolutionary genetics. New York (NY): Columbia University Press. 512p.
- 17.- NYBOM, H. 2004. Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. *Molecular Ecology* 13: 1143-1155.
- 18.- PELLARIN, M.G.; ALBRECHT, C.; ROJAS, M.J.; AGUILAR, J.J.; KONIGHEIM, B.S.; PARAJE, M.G.; ALBESA, I. Y ERASO, A.J. 2013. Inhibition of cytotoxicity of Shiga toxin of *Escherichia coli* O157: H7 on vero cells by *Prosopis alba* Griseb (Fabaceae) and *Ziziphus mistol* Griseb (Rhamnaceae) extracts. *Journal of Food Protection* 76: 1733-1739.
- 19.- PRADEEP, R.; SARLA, N. Y SIDDIQ E.A. 2002. Inter simple sequence repeats (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica* 128 (1): 9-17.
- 20.- PRESTON, L.R.; HARKER, N.; HOLTON, T. Y MORRELL, M.K. 1999. Plant cultivar identification using DNA analysis. *Plant varieties and seeds* 12: 191-205.
- 21.- RICHARDSON, J.E.; FAY, M.F.; CRONK, Q.C.B. Y CHASE, M.W. 2000. A revision of the tribal classification of Rhamnaceae. *Kew Bulletin* 55: 311-340.
- 22.- SAHA, D.; SRIVASTAVA, S.C. Y RAMANI, R. 2012. Genetic relationships among fruit cultivars and host plants of Indian lac insect in ber (*Ziziphus mauritiana* Lam.) revealed by RAPD and ISSR markers. *Indian Journal of Biotechnology* 12: 170-177.
- 23.- SINGH, A.K.; SHARMA, P.; SINGH, R.; SINGH, B.; KOUNDAL, K.R. Y SINGH, N.K. 2007. Assessment of genetic diversity in *Ziziphus mauritiana* using inter-simple sequence repeat markers. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology* 16(1): 35-40.
- 24.- SINGH, A.K.; SINGH, R. Y SINGH, N.K. 2009. Comparative evaluation of genetic relationships among ber (*Ziziphus* sp.) genotypes using RAPD and ISSR marker. *Indian Journal of Genetics and Plant Breeding* 69(1): 50-57.
- 25.- TOMAS, P.A.; GOTTLIEB, A.M.; SCHRAUF, G.E. Y POGGIO, L. 2013. Utilización de marcadores morfológicos y moleculares AFLP en la identificación de germoplasma nativo y cultivado de *Elymus scabrifolius* (Poaceae). *Rev. FCA UNCUYO* 45(2): 85-100.
- 26.- TORTOSA, R.D. 1995. *Rhamnaceae*. *Flora Fanerogámica Argentina* 9: 1-18.
- 27.- YOUNG, A.; BOYLE, T. Y BROWN, T. 1996. The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. *Tree* 11: 413-418.