



**ESTUDIOS CITOGENÉTICOS
EN EL COMPLEJO
CALCEOLARIA POLYRHIZA CAV.
(CALCEOLARIACEAE)**

2017

Tesista: Prof. Sebastian R. Mermoud
Directora: Dra. Maria Cristina Acosta
Co-directora: Dra. Andrea Cosacov



FCEFyN

Facultad de
Ciencias Exactas,
Físicas y Naturales



Universidad Nacional de Córdoba

Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales

Laboratorio de Ecología Evolutiva y Biología Floral

TESINA:

**ESTUDIOS CITOGENÉTICOS
EN EL COMPLEJO
CALCEOLARIA POLYRHIZA CAV.
(CALCEOLARIACEAE)**

2017

Título del trabajo: Estudios citogenéticos en el complejo *Calceolaria polyrhiza* CAV. (Calceolariaceae)

Tesinista: Prof. Sebastian
Ricardo Mermoud

Firma.....

Directora: Dra. María Cristina
Acosta

Firma.....

Co- directora: Dra. Andrea
Cosacov

Firma.....

Tribunal evaluador

Dr. Andrea Aristides Cocucci

Firma.....

Dra. María Cristina Acosta

Firma.....

Dra. Marisel Analia Scaldaferrro

Firma.....

La telaraña

Bebeagua, sacerdote de los sioux, soñó que seres jamás vistos tejían una inmensa telaraña alrededor de su pueblo. Despertó sabiendo que así sería, y dijo a los suyos: *“Cuando esa extraña raza termine su telaraña, nos encerrarán en casas grises y cuadradas, sobre la tierra estéril, y en esas casas moriremos de hambre”*

Eduardo Galeano

“Úselo y tírelo”

INDICE

RESUMEN	7
1. INTRODUCCIÓN.....	8
1.1. OBJETIVOS GENERALES	12
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	12
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	13
2.1. OBTENCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL	13
2.2. GERMINACIÓN DE SEMILLAS Y FIJACIÓN DEL MATERIAL VEGETAL ..	15
2.3. OBTENCIÓN DE PREPARADOS CROMOSÓMICOS	15
2.4. BANDEO CROMOSÓMICO CMA/DA/DAPI	15
2.5. ANÁLISIS DE DATOS CROMOSÓMICOS.....	16
2.6. ANÁLISIS DE LOS CARIOTIPOS Y OBTENCIÓN DE DATOS	
CUANTITATIVOS Y CUALITATIVOS	16
2.7. ANÁLISIS DE DATOS	17
2.7.1. <i>Análisis univariados</i>	18
3.7.2. <i>Análisis fenético</i>	18
2.7.2. <i>Mapeo de caracteres</i>	18
3. RESULTADOS	19
4.1. ESTRUCTURA DE LOS CARIOTIPOS Y FRECUENCIA DE CARACTERES	
CUALITATIVOS Y CUANTITATIVOS.....	19
4.1.1. <i>Números cromosómicos</i>	19
4.1.2. <i>Tamaño cromosómico</i>	19
4.1.3. <i>Satélites</i>	23
4.1.4. <i>Formulas cariotípicas y asimetrías</i>	24
4.1.5. <i>Bandeo de Fluorescencia</i>	25
4.2. ANÁLISIS UNIVARIADOS DE CARACTERES CROMOSÓMICOS	
CUANTITATIVOS	32
4.3. ANÁLISIS FENÉTICO.....	32
4.4. MAPEO DE CARACTERES	33
DISCUSIÓN	36

5.1. NÚMEROS CROMOSÓMICOS: DIPLOIDÍA Y POLIPLOIDÍA EN <i>CALCEOLARIA</i> 36	
5.2. BANDEO DE FLUORESCENCIA: VARIACIÓN CARIOTÍPICA ENTRE LOS MORFOTIPOS 38	
CONCLUIONES	42
AGRADECIMIENTOS.....	43
BIBLIOGRAFIA	43
ANEXOS	50
ANEXO I - DATOS CROMOSÓMICOS DE CADA LOCALIDAD ANALIZADA	51
ANEXO II - ANÁLISIS DE CARACTERES CUALITATIVOS	56
<i>a) Tablas de frecuencia relativa y absoluta.....</i>	<i>56</i>
<i>b) Gráficos de frecuencias relativas de caracteres</i>	
<i> cualitativos</i>	<i>57</i>
ANEXO III -ANÁLISIS ANOVA PARA CARACTERES CUANTITATIVOS.....	59
<i>Análisis estadístico del valor cromosómico promedio (c) entre</i>	
<i> morfotipos</i>	<i>59</i>
<i>Análisis estadístico del índice braquial promedio (r) entre</i>	
<i> morfotipos</i>	<i>60</i>
<i>Análisis estadístico del porcentaje de heterocromatina (%HC)</i>	
<i> entre morfotipos</i>	<i>61</i>
<i>Análisis estadístico del largo total del complemento haploide</i>	
<i> (LTCH) entre morfotipos</i>	<i>62</i>
<i>Análisis estadístico del Índice de asimetría A1</i>	<i>63</i>
<i>Análisis estadístico del Índice de asimetría A2</i>	<i>64</i>
ANEXO IV - TABLA DE DATOS CUANTITATIVOS Y CUALITATIVOS CODIFICADOS PARA ANÁLISIS FENÉTICO.....	65
ANEXO V - ANÁLISIS DE MAPEO DE CARACTERES CROMOSÓMICOS.....	66
ANEXO VI – FOTOS DE POBLACIONES NO INCLUIDAS EN RESULTADOS ...	67

RESUMEN

Se realizó un análisis citogenético con el objetivo de describir la variabilidad intraespecífica del complejo *Calceolaria polyrhiza* CAV. y analizar si dicha variabilidad se corresponde con los morfotipos identificados para la especie. Por otro lado, también se propuso trazar las posibles tendencias de evolución cromosómica dentro de un contexto filogenético. El número cromosómico $2n = 2x = 18$ fue observado en tres de los cuatro morfotipos de *C. polyrhiza* (mendocina, lanceolata, y polyrhiza) y en *C. uniflora* y se reporta poliploidía para el morfotipo prichardii ($2n = 6x = 54$). El análisis cariotípico con la técnica de bandeo fluorescente permitió obtener valiosos marcadores cromosómicos para cada uno de los morfotipos. Los resultados muestran que existe variabilidad a nivel cariotípico tanto a nivel inter como intrapoblacional, dicha variabilidad no se encuentra distribuida de forma azarosa y se ajusta a los morfotipos descriptos. Se concluye que el morfotipo mendocina evidencia diferencias tales que podría reconsiderarse como una especie diferente, mientras que para los restantes tres morfotipos se sugiere un proceso de insipiente especiación.

1. INTRODUCCIÓN

Los cromosomas son los vehículos de la herencia en la mayoría de los organismos vivos. Ordenados de acuerdo a una serie de criterios cuantitativos y cualitativos, constituyen el cariotipo de un organismo, que se define por el número, tamaño, forma y arreglos internos del complemento cromosómico en metafase. Los cambios cariotípicos en plantas han sido ampliamente estudiados, y son atribuidos en su mayoría a la proliferación de elementos genéticos móviles (transposones), duplicación de genes o segmentos cromosómicos y poliploidía. Mientras la proliferación de transposones y retroelementos han sido vistos como cambios neutrales dentro de las especies, la poliploidía y la duplicación génica pueden ser factores causantes de divergencia adaptativa y aislamiento reproductivo ya que aumentan la variabilidad de alelos y esto puede promover la aparición de nuevos genes neofuncionales ventajosos (Holland y Chen, 2001; Sankoff 2001; Crow y Wagner 2006). Además, los arreglos cromosómicos tales como inversiones y translocaciones en estado heterocigotas pueden tener efectos dramáticos sobre la fertilidad de las gametas, y por lo tanto, pueden jugar un rol importante en la especiación (Stebbins 1971; King 1993; Livingstone y Rieseberg 2003; Dobigny et al. 2005). Los análisis cromosómicos han contribuido en gran medida a estudios de evolución y de taxonomía, ya que el conocimiento del número y la morfología cromosómica han permitido inferir relaciones principalmente entre especies y géneros. Sin embargo, la variabilidad intraespecífica del cariotipo generalmente no ha sido muy explorada y muchas veces la descripción del cariotipo de una especie se realiza en base a unos pocos individuos de una única localidad (Guerra 2012). En este contexto, la mayoría de los estudios que analizan la variabilidad intraespecífica tratan sobre variaciones en los niveles de ploidía (Neffa y Fernández 2001; Scaldaferrero et al. 2012), y recientemente se ha comenzado a explorar la variación cariotípica estructural (Urdampilleta et al. 2005; Siljak-Yakovlev y Peruzzi 2012; Chalup et al. 2012; Sousa et al. 2012; Vandana y Chaudhary 2013).

Las técnicas de bandeo con fluorocromos dependen de la afinidad de la heterocromatina (HC) a un fluorocromo específico (Guerra 2000; Barros e Silva y Guerra 2010). En particular, el bandeo con cromomicina (CMA) y 4'-6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) revela regiones heterocromáticas ricas en pares de nucleótidos GC y AT, respectivamente (Schweizer 1980). Este método de tinción brinda información más

detallada sobre el complemento cromosómico, ya que los cromosomas pueden ser individualizados por su estructura interna (Barros e Silva y Guerra 2010). Así, la descripción de la presencia, tipo, cantidad y distribución de la HC ha permitido revelar diferencias entre especies aún cuando éstas presentaban el mismo cariotipo con técnica clásica (Acosta et al. 2012; Miguel et al. 2012) y aportar fuerte evidencia de homología entre bandas heterocromáticas por ancestría común (Ehrlich et al. 1997).

La familia Calceolariaceae (Andersson 2006; Cosacov et al. 2009) se distribuye en Nueva Zelanda y América (Molau 1988; Olmstead and Reeves 1995; Olmstead et al. 2001) aunque es en esta última donde se diversifica, estando presente los dos géneros incluidos en la familia, *Calceolaria* L. y *Jovellana* Ruiz & Pav. El género *Calceolaria* posee unas 250 especies que se distribuyen desde el centro de México hasta el sur de Argentina con diferentes centros de diversificación de los que se destacan el centro de Chile y la deflexión de Huancabamba en el norte de Perú (Molau 1988; Ehrhart 1997, 2000). El género *Calceolaria* se especula que se habría originado hacia el sur de su distribución en Sudamérica y mediante procesos de especiación alopátrica asociados al levantamiento andino habría colonizado la cordillera de los Andes hacia el norte (Cosacov et al. 2009).

Morfológicamente el género se destaca por su particular corola zigomorfa con dos labios generalmente desiguales, el inferior sacciforme con un elaióforo compuesto por tejido tricomático glandular ubicado a dorsal, productor de aceites que sirven como recompensa floral de distintos polinizadores (Vogel 1974; Sérsic 2004; Cosacov et al. 2012). Varios representantes de este género son considerados plantas tóxicas para los insectos, generando así una posible fuente de moléculas orgánicas con potenciales usos como biopesticida (Khambay et al. 1999) y antimicótico (Falcao et al. 2006; Woldemichael et al. 2003).

En cuanto a su cariología, los estudios cromosómicos en el género son escasos y únicamente tratan de recuentos cromosómicos, siendo nulos los análisis cariotípicos detallados (Srinath 1940; Molau 1966; Ehrhart 1997, 2000; Andrada et al. 2010). El número básico es $x=9$, excepto para 8 especies pertenecientes a la sección *Calceolaria* con $x=8$. Es notable la distribución de la ploidía ya que las especies tropicales estudiadas por Molau (1988) son tetraploides con $2n=4x=36$ y raramente diploides ($2n=2x=18$) y octoploides ($2n=8x=72$), en contraste con las especies de Argentina y

Chile donde la poliploidía es esporádica en las regiones más australes y la diploidía es más frecuente (Ehrhart 1997, 2000). Ehrhart (1997) propone un cariotipo “promedio” conformado por 9 cromosomas de tamaño muy pequeño (menores a 3 μm) con satélites ubicados en brazo corto y en general con 7 u 8 pares de metacéntricos y 1 o 2 submetacéntricos.

En la Patagonia Argentina se encuentran 16 especies de *Calceolaria* que crecen en la estepa y en el bosque andino patagónico (Correa 1998; Zuloaga y Morrone 1999). *Calceolaria polyrhiza* ($2n=2x=18$; Ehrhart 2000) es una hierba perenne restringida a las regiones más australes de Chile y Argentina, se distribuye desde el sureste de San Juan (31°S) hasta el sur de la provincia de Santa Cruz (52°S) por lo que habita en ambientes muy heterogéneos. La especie posee gran variabilidad interpoblacional. Presenta cuatro morfotipos diferenciados (Fig. 1) por caracteres cualitativos y cuantitativos tales como el tipo de pilosidad, largo de entrenudos, cantidad de flores, diseño o manchas de la corola, largo del peciolo y la forma de las hojas, entre otros (Strelin 2009; Strelin et al. 2013). En primera instancia estos morfotipos fueron clasificados como especies distintas (*C. polyrhiza*, *C. mendocina*, *C. lanceolata* y *C. prichardii*) por Descole y Borsini (1954), sin embargo Ehrhart (2000) las agrupó en una sola especie por su morfología floral y seminal quedando así una especie altamente polimórfica, el argumento esgrimido para explicar esto fue una cierta plasticidad causada por las variaciones ambientales en todo su rango geográfico de distribución.

Los análisis de agrupamiento con datos de morfometría geométrica realizado en este complejo de especies (Strelin 2009; Strelin et al. 2013) muestran que los grupos obtenidos se ajustarían a las especies propuestas por Descole y Borsini (1954) y Correa (1999) siendo los rasgos florales los caracteres más determinantes en dicha agrupación. Estos trabajos también sugieren que la variabilidad floral no se encuentra distribuida aleatoriamente en la naturaleza, y que la divergencia fenotípica de las morfoespecies podría deberse a eventos de aislamiento geográficos y mecánico mediado por polinizadores (Strelin et al. 2013).

En el presente trabajo se planea describir los cariotipos pertenecientes a individuos de diferentes localidades de los distintos morfotipos de *C. polyrhiza* con la técnica de bandeado fluorescente. La hipótesis propuesta es que existen diferencias cariotípicas intraespecíficas que se corresponden a los diferentes morfotipos del complejo.



Fig.1. Fotografías de los cuatro morfotipos de la especie *Calceolaria polyrhiza*. A: lanceolata; B: mendocina; C: polyrhiza, D: prichardii.

OBJETIVOS

1.1. OBJETIVOS GENERALES

1- Describir la variabilidad intraespecífica a nivel cariotípico del complejo *Calceolaria polyrhiza* y analizar si se corresponde con las morfoespecies identificadas por Descole y Borsini (1954).

2- Trazar las posibles tendencias de evolución cromosómica dentro del complejo *C. polyrhiza* en un contexto filogenético.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1) Obtener datos cariológicos (número cromosómico, fórmula cariotípica, presencia y distribución de heterocromatina) con el fin de caracterizar y circunscribir los cariotipos de cada morfotipo dentro del complejo *Calceolaria polyrhiza*.

2) Analizar si el agrupamiento de las diferentes poblaciones estudiadas con datos cromosómicos se corresponde con los agrupamientos derivados de los análisis morfométricos previos.

3) Mapear los caracteres cromosómicos en la reconstrucción filogenética obtenida previamente a partir de datos moleculares.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Obtención del material vegetal

Para este estudio se utilizaron semillas colectadas en 2-3 localidades por morfotipo del complejo *C. polyrhiza*. Para la identificación de los morfotipos se siguió a Descole y Borsini (1954) que es coincidente con lo reportado por Strelin et al. (2013), excepto para la localidad de Lochiel, ya que se trata de una localidad con fenotipo afín al morfo mendocina, pero su localización geográfica no se encuadra dentro de lo originalmente propuesto para este morfotipo por Descole y Borsini (1954). Además, se colectaron semillas de una localidad de *C. uniflora* para ser utilizada como grupo externo en los análisis filogenéticos. En la Fig. 2 y en la Tabla 1 se detallan los lugares de procedencia del material estudiado.

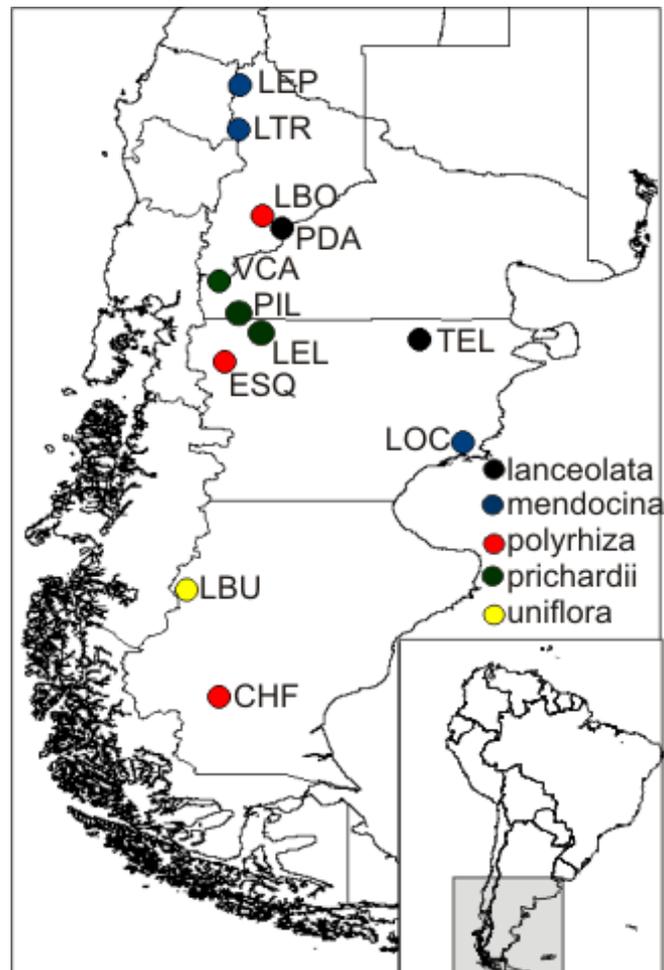


Fig. 2. Mapa de Patagonia en el que se observa la ubicación de los sitios muestreados para cada morfotipo. La información de cada localidad se detalla en la tabla 1.

Morfotipo	Código	Localidad- Provincia	Latitud	Longitud	Altitud	N° EH
<i>Calceolaria polyrhiza</i> CAV.						
lanceolata	PDA	Piedra Del Águila -Neuquén	-39,987	-70,040	667	AAC 3452
lanceolata	TEL	Telsen - Chubut	-42,449	-67,058	596	AAC 3388
mendocina	LTR	Laguna Trolope - Neuquén	-36,838	-70,964	1555	AAC 4007
mendocina	LEP	Lagunas Epulafquen - Neuquén	-37,825	-71,013	1517	AAC 4101
mendocina	LOC	Lochiel - Chubut	-44,705	-66,119	348	AAC 3390
polyrhiza	CHF	Charles Fuhr - Santa Cruz	-50,317	-71,438	365	AAC 4195
polyrhiza	ESQ	Esquel - Chubut	-42,922	-71,301	961	
polyrhiza	LBO	La Bomba– Neuquén	-39,731	-70,466	990	AAC 4003
prichardii	LEL	Leleque- Chubut	-42,466	-71,097	772	AAC 3490
prichardii	PIL	Piltriquitron- Rio Negro	-41,972	-71,479	1182	AAC 4106
prichardii	VCA	Villa Catedral - Rio Negro	-41,173	-71,438	1039	AAC 2428
<i>Calceolaria uniflora</i> LAM.						
	LBU	Lago Burmeister - Santa Cruz	-47,950	-72,121	914	

Tabla 1. Listado del material analizado. Se indica el código asignado en la Figura 2, morfotipo, localidad y provincia, coordenadas geográficas y altitud sobre el nivel del mar. N°EH: Número de ejemplar de herbario.

2.2. Germinación de semillas y fijación del material vegetal

Las semillas se colocaron a germinar en una cámara de cultivo con regulación de temperatura y fotoperiodo, dicha cámara se programó con un fotoperiodo de 15 horas de luz y 8 horas de oscuridad, una temperatura diurna de 15°C y de 10°C por la noche. Las radículas de 0,5-1 cm de longitud fueron pretratadas utilizando 2 mM 8-hidroxiquinolina (8-HQ) como inhibidor del huso acromático durante 1 h a temperatura ambiente y oscuridad y 3 h a 8°C en heladera. Posteriormente, fueron fijadas en solución Farmer (3 partes de alcohol etílico absoluto y 1 parte de ácido acético glacial) por un mínimo de 12 h a 4°C, para luego ser conservadas a -20°C hasta su utilización.

2.3. Obtención de preparados cromosómicos

Las preparaciones cromosómicas, se llevaron a cabo mediante digestión enzimática con celulasa 1% (p/v) y pectinasa 1% (v/v) a 37°C durante 120 minutos según Schwarzacher et al. (1980) y aplastamiento de los ápices radicales con ácido acético al 60%. Los cubreobjetos fueron retirados por congelamiento con CO₂ según Bowen, (1956) y los preparados se conservaron a -20°C para utilizarlos en las diferentes técnicas experimentales. Los pasos realizados fueron:

- 1- Lavado de los ápices radicales fijados en tampón citrato 0,01 M por 10 min.
- 2- Maceración en solución enzimática de celulasa 1% (p/v) y pectinasa 1% (v/v) a 37°C por 120 min.
- 3- Lavado en tampón citrato por 15 min.
- 4- Transferencia a ácido acético 60% y aplastamiento en portaobjetos (Squash).
- 5- Remoción del cubreobjetos por congelamiento con CO₂.
- 6- Secado al aire.

2.4. Bando cromosómico CMA/DA/DAPI

Se llevó a cabo la técnica de tinción triple (CDD) con los fluorocromos cromomicina A3, distamicina A y 4'-6-diamidino-2-fenilindol (CMA/DA/DAPI), estos fluorocromos revelan simultáneamente bandas heterocromáticas ricas en pares de nucleótidos GC (bandas CMA/DA positivas y DA/DAPI negativas) y AT (bandas CMA/DA negativas y DA/DAPI positivas) (Schweizer, 1981). Para realizar el bando se procedió según Schweizer (1976, 1980), los pasos seguidos fueron:

1. Agregado de 9 μ l de una solución de cromomicina A₃ (CMA) (0,5 g/ml tampón McIlvaine) al preparado e incubación en cámara húmeda y oscuridad a temperatura ambiente por 90 min.
2. Remoción del cubreobjetos y lavado con agua destilada. Secado al aire.
3. Agregado de 8 μ l de solución de distamicina A (DA) (0,1 g/ml tampón McIlvaine) e incubación en cámara húmeda y oscuridad a temperatura ambiente por 60 min.
4. Igual procedimiento que en el paso 2.
5. Agregado de 8 μ l de una solución de 4'-6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (2 μ g/ml tampón McIlvaine) e incubación en cámara húmeda y oscuridad a temperatura ambiente por 45 min.
6. Igual procedimiento que en el paso 2.
7. Montaje del preparado en medio 1:1 de glicerol/tampón McIlvaine.
8. Envejecimiento del preparado a 37°C en oscuridad por 7 días previo a la observación.

2.5. Análisis de datos cromosómicos

Los cromosomas fueron observados y fotografiados en un microscopio óptico Leica DMLB utilizando epifluorescencia, obteniéndose fotomicrografías mediante una cámara digital Leica DC 250 provista del analizador de imágenes Leica IM 1000. Para microscopía de epifluorescencia se utilizaron los juegos de filtros apropiados para la excitación de los fluorocromos empleados en cada caso.

2.6. Análisis de los cariotipos y obtención de datos cuantitativos y cualitativos

Para el análisis morfométrico del cariotipo se utilizó el software OPTIMAS versión 5.2 (Optimas Corporation Bothell, Washington, USA). Se efectuaron mediciones a los cromosomas referidas a la longitud del brazo corto (s), largo (l) y total (c), se calculó en cada caso la media y la desviación estándar, datos con los que se elaboraron los idiogramas respectivos de cada población analizada. Para la descripción y ordenamiento de los cromosomas se empleó el índice braquial (r) siguiendo la nomenclatura de Levan et al. (1964).

$$r = l/s$$

Donde: **l** = longitud del brazo largo y **s** = longitud del brazo corto.

Según su índice braquial, los cromosomas fueron ubicados dentro de las siguientes categorías:

- Metacéntricos $r = 1- 1,70$
- Submetacéntricos $r=1,71-3,00$
- Subtelocéntricos $r=3,01-7,00$
- Telocéntricos $r= 7,01-\infty$

Luego, los cromosomas fueron ordenados de forma decreciente según su longitud dentro de las categorías anteriormente mencionadas. Se calculó el largo total del complemento haploide “LTCH”, sumando la medida del largo total de cada par cromosómico, el largo cromosómico promedio “ c ”, y la razón entre el cromosoma más largo y el más corto “ R ”. Finalmente, se realizaron los idiogramas de cada especie y morfotipo, utilizando los valores promedios de cada par cromosómico.

La asimetría de los cariotipos fue estimada usando los índices de asimetría intracromosómica “ A_1 ” e intercromosómica “ A_2 ” propuestos por Zarco (1986) y se clasificaron según el sistema de categorías de Stebbins (1971).

$$A_1 = 1 - (\sum b_i / B_i) / n$$

Donde: b_i = largo promedio del brazo corto.

B_i = largo promedio del brazo largo.

n = número de cromosomas homólogos.

$$A_2 = S/X$$

Donde: X = media del largo cromosómico.

S = desvío estándar del largo cromosómico.

A_1 y A_2 varían entre 0 y 1. Cuando A_1 tiende a cero indica que los cromosomas son en su mayoría metacéntricos, y cuando A_2 es próximo a cero, indica que los cromosomas tienen un tamaño similar.

2.7. Análisis de datos

Para evaluar estadísticamente la diferenciación en las variables cuantitativas obtenidas entre morfoespecies/localidades se realizaron análisis univariados de caracteres cariotípicos cuantitativos. Luego, para identificar patrones de agrupamiento por similitud entre las muestras analizadas, se realizó un análisis fenético utilizando la técnica UPGMA. Finalmente, para analizar estos patrones de diferenciación y

agrupamiento en un contexto evolutivo, se realizó un mapeo de caracteres a fin de detectar posibles rutas evolutivas de los cariotipos.

2.7.1. Análisis univariados

A fin de evaluar si había diferencias significativas en las distintas variables obtenidas entre morfotipos, se realizaron análisis de la varianza paramétricos (ANOVA), ya que la prueba de Shapiro-Wilks de distribución normal de los residuos no fue significativa ($p > 0,05$) como tampoco la prueba de varianza de los residuos ($p > 0,05$) (Anexo III). Cuando los ANOVAs dieron significativos, se realizó el test *a posteriori* de Tukey. Para ello se utilizó el programa INFOSTAT versión 2012 (Di Rienzo et al. 2012).

3.7.2. Análisis fenético

Para el mismo conjunto de variables cuantitativas, se realizó un análisis fenético a fin de detectar razas cromosómicas dentro del complejo *C. polyrhiza*. El agrupamiento fenético se efectuó mediante la técnica de ligamiento promedio, empleándose la media aritmética no ponderada (UPGMA) (Sneath y Sokal 1973; Crisci y López Armengol 1983). Para estandarizar la matriz de datos, calcular la distancia euclídea promedio, generar el fenograma UPGMA y obtener el coeficiente de correlación cofenético, se utilizó el programa Past (Hammer et al. 2001) e INFOSTAT versión 2012 (Di Rienzo et al. 2012).

2.7.2. Mapeo de caracteres

Los datos cromosómicos obtenidos fueron mapeados sobre el árbol filogenético derivado de las secuencias de ADN ribosómico y cloroplastial según Cosacov et al. (2009) utilizando el programa MESQUITE versión 2.7.1 por medio del criterio de parsimonia (Maddison y Maddison 2007). Cabe aclarar que para el mapeo de caracteres no se utilizaron los datos cariotípicos de la localidad de Lochiel debido a las grandes diferencias observadas con las demás localidades pertenecientes al mismo morfotipo (ver resultados).

3. RESULTADOS

Se examinaron los cromosomas mitóticos de 1-3 individuos pertenecientes a 11 localidades correspondientes a los cuatro morfotipos de *C. polyrhiza*. Además, se realizó el análisis cariotípico de 3 individuos pertenecientes a una población de *C. uniflora*. Los datos obtenidos se resumen en la Tabla 2. Las fotos de las metafases más representativas para cada morfoespecie analizada se observan en las figuras 3.1, 3.2, 3.3 y 3.4. Los idiogramas correspondientes para cada localidad estudiada se presentan en la figura 4. Las tablas con las medias cromosómicas y los desvíos estándar para cada complemento haploide de cada morfotipo/localidad analizada se presentan en el Anexo I.

4.1. Estructura de los cariotipos y frecuencia de caracteres cualitativos y cuantitativos

4.1.1. Números cromosómicos

El número cromosómico somático $2n=2x=18$ fue registrado en tres de los cuatro morfotipos de *C. polyrhiza* (mendocina, lanceolata, y polyrhiza) y en *C. uniflora* (Tabla 2). La localidad Villa Catedral analizada del morfotipo prichardii es poliploide con $2n=6x=54$. Además se contaron los cromosomas en otras dos localidades pertenecientes al morfotipo prichardii, Leleque y Cerro Piltriquitron, que también fueron poliploides con $2n=6x=54$ (Anexo VI), pero por falta de suficientes individuos y metafases no se incluyeron en los análisis cariotípicos.

4.1.2. Tamaño cromosómico

Las longitudes cromosómicas de los morfotipos/localidades estudiadas de *C. polyrhiza* se resumen en la Tabla 2 y el detalle de las medidas cariotípicas de cada localidad se presentan en el Anexo I. Se puede observar que los cromosomas varían en un rango de 3,53-1,86 μm . El cromosoma más chico corresponde al par n° 26 del morfotipo prichardii (1,86 μm) y el más grande es el par n° 1 del morfotipo mendocina de la población de Epulauquen (3,53 μm). El LTCH presenta variabilidad siendo de 20,96 μm el menor valor, observado en el morfotipo polyrhiza, de la localidad de Esquel, y de 70,09 μm el valor más alto, correspondiente al morfotipo prichardii, de la localidad Villa Catedral. Por otra parte, la longitud cromosómica promedio (entre paréntesis se

indica el LTCH) presenta cierta variabilidad entre morfotipos, en el morfotipo polyrhiza se hallaron los cromosomas comparativamente más pequeños, se registró 2,17 μm (24,85 μm) para la población de Charles Fuhr, en Esquel, 2,32 μm (20,96 μm), y en La Bomba, 2,48 μm (22,51 μm). El morfotipo mendocina mostró los tamaños cromosómicos mayores, registrándose valores promedio de 2,73 μm (22,35 μm) en la localidad de Lochiel, 2,74 μm (24,67 μm) en Laguna Trolope y 2,92 μm (26,27 μm) en Laguna Epulauquen. Por otro lado, los morfotipos lanceolata y prichardii presentaron tamaños cromosómicos intermedios. Para el morfotipo lanceolata de Telsen se registró un tamaño de 2,45 μm (22,07 μm) y para Piedra del Águila, de 2,69 μm (24,18 μm); en la única localidad estudiada del morfotipo prichardii en Villa Catedral, se obtuvo un valor de 2,59 μm (70,09 μm).

Finalmente, en *Calceolaria uniflora* los cromosomas también fueron pequeños y se reportó un rango de longitud similar al observado en el complejo *C. polyrhiza*, observándose una longitud cromosómica que varió entre 2,89-2,24 μm (longitud cromosómica promedio de 2,49 μm) y un valor de LTCH de 22,39 μm .

Localidad de procedencia	morfotipo	n	Fórmula cariotípica (n)	Pares con NOR	% HC	LTCH (de)	c (de)	Rango de longitudes cromosómicas	r (de)	R	A ₁	A ₂	TAC
<i>C. polyrhiza</i>													
Piedra del Águila	lanceolata	18	8m+1sm	5 m 7 m	4,01	24,18 (3,63)	2,69 (0,4)	3,23-2,29	1,33 (0,05)	1,41	0,23	0,15	1A
Telsen	lanceolata	18	6m+3sm	3 m 5 m	3,31	22,07 (2,19)	2,45 (0,21)	2,86-2,19	1,51 (0,08)	1,32	0,31	0,08	1A
Laguna Trolope	mendocina	18	4m+5sm	3 m 6 sm	3,7	24,67 (2,08)	2,74 (0,23)	3,17-2,25	1,62 (0,07)	1,41	0,36	0,08	1A
Lagunas Epulafquen	mendocina	18	4m+5sm	3 m 6 sm	3,74	26,27 (3,44)	2,92 (0,38)	3,53-2,27	1,69 (0,04)	1,55	0,37	0,13	2A
Lochiel	mendocina	18	6m+3sm	2 m	2,55	22,35 (2,28)	2,73 (0,25)	2,77-2,06	1,56 (0,05)	1,35	0,33	0,09	2A
Charles Fuhr	polyrhiza	18	6m+3sm	4 m	1,9	24,85 (2,84)	2,76 (0,32)	3,24-2,34	1,49 (0,06)	1,38	0,32	0,11	1A
Esquel	polyrhiza	18	6m+3sm	4 m	2,15	20,96 (0,66)	2,32 (0,07)	2,60-2,03	1,46 (0,04)	1,28	0,27	0,08	1A
La Bomba	polyrhiza	18	6m+3sm	4 m	2,44	22,51 (2,96)	2,48 (0,33)	2,96-2,11	1,60 (0,07)	1,40	0,33	0,13	2A
Villa Catedral	prichardii	54	21m+6sm	11 m	1,68	70,09 (9,92)	2,59 (0,36)	3,14-1,86	1,36 (0,09)	1,69	0,27	0,14	1A
<i>C. uniflora</i>		18	6m+3sm	3m	1,93	22,39 (1,70)	2,49 (0,19)	2,89-2,24	1,49 (0,04)	1,29	0,31	0,08	1A
Lago Burmeister													

Tabla 2. Datos cariotípicos de las localidades y morfotipos analizados de *C. polyrhiza* y del grupo externo *C. uniflora*. Abreviaturas: n: número cromosómico; m y sm: cromosomas metacéntricos y submetacéntricos, respectivamente; NOR: regiones organizadoras nucleolares; %HC: porcentaje de heterocromatina; LTCH: Largo total del complemento haploide (µm);(de): desvío estándar; A₁ y A₂, índices de asimetría intra e intercromosómica, respectivamente; r: razón promedio entre el brazo más corto y el más largo; R: razón entre el cromosoma más corto y el más largo de la muestra analizada; TAC: Tipo de asimetría cariotípica según Stebbins (1971).

Morfotipo	Localidad	Pares con SAT	% de células con SAT		% de células sin SAT	Tipo de satélite	
			En un homólogo	En ambos homólogos		Macro	Lineal
<i>Calceolaria polyrhiza</i>							
lanceolata	Piedra del Águila	5 m	20	10	70		
		7 m	10	30	60		X
lanceolata	Telsen	3 m	40	20	40		
		5 m	0	10	90		X
mendocina	Laguna Trolope	3 m	80	20	0		
		6 sm	50	0	50		X
mendocina	Lagunas Epulafquen	3 m	40	0	60		
		6 sm	60	0	40		X
mendocina	Lochiel	3 m	30	60	10		X
polyrhiza	Charles Fuhr	4 m	30	60	10		X
polyrhiza	Esquel	4 m	0	90	10		X
polyrhiza	La Bomba	4 m	30	20	50		X
prichardii	Villa Catedral	11 m	75	0	25	X	
<i>Calceolaria uniflora</i>							
	Lago Buermeister	3 m	33	56	11		X

Tabla 3. Datos del porcentaje de células con satélites y sin satélites de las localidades y morfotipos analizados de *C. polyrhiza* y del grupo externo *C. uniflora*. Se detalla la presencia de satélites en un homólogo o en ambos y el tipo de satélite registrado en cada población.

4.1.3. Satélites

La frecuencia de satélites (SATs) en pares metacéntricos fue del 84,62% mientras que el restante 15,38% se presentaron en pares submetacéntricos. El par cromosómico 4m (23,07%) fue el que más frecuentemente presentó SATs. Las frecuencias para los restantes pares fue de 23% en el par3m, 15,38% en el 5m, 15,38% en el 6 sm y finalmente el 7% para el 11m, 2m y 7m (Anexo II a y b).

Todas las localidades examinadas presentaron 1 o 2 pares de cromosomas con regiones organizadoras nucleolares (NORs) y satélites asociados, todos ubicados en los brazos cortos de diferentes pares cromosómicos (Tabla 2). En el 88,8% de las localidades analizadas se observó un par de cromosomas con sitios NORs, en el restante 12,2% se observaron 2 pares (Fig. 3, Tabla 2 y Anexo II a y b)

En todas las localidades pertenecientes al morfotipo polyrhiza se localizaron los sitios NORs siempre en el par metacéntrico n° 4. El porcentaje de células con satélites y sin ellos varió entre poblaciones. Estos datos se observan en la Tabla3. Se destaca la predominancia de células con satélites en ambos homólogos en el 60% y 90% de las células de Charles Fuhr y Esquel respectivamente. Por otro lado, en la localidad de La Bomba el 50% de las células no mostraron satélites mientras que en el 50% restante se evidenciaron satélites tanto en ambos cromosomas homólogos (30% de las células analizadas) como en uno de ellos (20%).

El morfotipo lanceolata presentó variabilidad intra e interpoblacional en la localización de los sitios NOR. En la localidad de Telsen se registró un par de NORs en uno de los individuos analizados, y dos pares en el resto. Estos NORs se encontraron en los brazos cortos del cromosoma 3 m y 3 m y 5 m para individuos con 1 y 2 pares, respectivamente (Fig.3-A). Por otro lado, en la localidad de Piedra Del Águila los NORs se localizaron en los cromosomas 5m y 7m. El porcentaje de células con y sin satélites en Telsen fue del 60% (40% y 20% en uno y ambos homólogos respectivamente) y 40% sin satélites para el cromosoma n° 3m. El cromosoma n° 5m presentó satélites solo en el 10% de las células analizadas (siempre en ambos homólogos). En la localidad de Piedra del Águila el cromosoma 5 m presentó satélites en el 30% de las células (10% en uno de los homólogos y 30% en ambos homólogos), el restante 70% no presento satélites, el cromosoma 7 m presentó satélites en el 40% de las

células (10% en uno de los homólogos y 30% en ambos homólogos), el restante 60% no presentó satélites (Tabla 3).

En las localidades pertenecientes al morfotipo mendocina se encontró variabilidad interpoblacional. Por un lado, en la localidad de Lochiel se evidenció un par de satélites ubicado en el par metacéntrico 3, mientras que en las poblaciones de Lagunas de Epulaufquen y Laguna Trolope se encontraron dos pares ubicados en los cromosomas metacéntricos 3 y submetacéntricos 6 (Fig. 3-B). En la localidad de Lochiel el porcentaje de células con y sin satélites fue de 90% (60% en ambos homólogos y 30% en un solo homólogo) y 10%, respectivamente. En la población de Laguna Trolope el porcentaje de células con satélites fue de 100% (20% en ambos homólogos y 80% en un solo homólogo) para el cromosoma 3 m, y 50% (todos en un solo homólogo) para el cromosoma 6 sm. En las localidades Lagunas Epulafquen el cromosoma 3m presentó satélites en un homólogo en el 40% de las células, el restante 60% no presentó. El cromosoma 6 sm presentó satélites en un homólogo en el 60% de las células, mientras que en el restante 40% no los presentó.

En el morfotipo *prichardii* se encontró un par de NORs en el cromosoma metacéntrico 11 (Fig. 3-D), tratándose de un macrosatélite diferencia de los otros tres morfotipos que siempre presentaron microsátélites. Como se observa en la Tabla 3, este macrosatélite se observó en el 75% de las células, mientras que en el restante 25% no se observó satélite.

Por último, en *C. uniflora* se observó la presencia de NORs asociados a satélites en el cromosoma metacéntrico 3. En el recuento de células en metafase se observó que el 81% poseía satélite (56% en ambos homólogos y 33% en un solo homólogo) mientras que el restante 11% no presentó satélites.

4.1.4. Formulas cariotípicas y asimetrías

Se registraron 4 formulas cariotípicas de las cuales el guarismo $6m+3sm$ se mantuvo estable en el 55,55% de las localidades analizadas, la fórmula $8m+1sm$ y $21m+6sm$ se presentaron en el 11% cada una y el restante 22% presentó la fórmula $4m+5sm$ (anexo II a y b). Como se observa en los idiogramas de la Figura 4y en la Tabla 2, en las localidades estudiadas del morfotipo *polyrhiza* la fórmula cariotípica es siempre $6m+3sm$, mientras que en el morfotipo *lanceolata* se observó variabilidad interpoblacional siendo $6m+3sm$ en Telsen y $8m+1sm$ en Piedra Del Águila. También

se encontró variabilidad en el morfotipo mendocina, siendo 6m+3sm en Lochiel y 4m+5sm en Lagunas de Epulafquen y Laguna Trolope. En el morfotipo prichardii la fórmula fue 21 m+ 6 sm. En la especie *C. uniflora* se volvió a observar la fórmula 6m+3sm como en el morfotipo polyrhiza.

La proporción de cromosomas metacéntricos es mayor a la de submetacéntricos salvo en las poblaciones de Lagunas Epulafquen y Laguna Trolope pertenecientes al morfotipo mendocina donde la proporción de submetacéntricos fue superior.

La asimetría de los cariotipos fue calculada con los índices A_1 y A_2 . El menor valor para el índice A_1 es registrado para la población de Piedra del Águila morfotipo lanceolata (0,23) mientras que el mayor valor (0,37) fue observado en el morfotipo mendocina en la población de Laguna Epulafquen. En tanto que el índice A_2 , varió entre 0,08 para las poblaciones de Telsen morfotipo lanceolata, Trolope morfotipo mendocina y Esquel morfotipo polyrhiza y 0,15 para Piedra del Águila morfotipo lanceolata (Tabla 2). Considerando la variación dentro de cada morfotipo, en el morfotipo polyrhiza los valores de A_1 y A_2 variaron entre 0,27-0,33 y entre 0,08 – 0,13, respectivamente; en el morfotipo lanceolata, entre 0,23-0,31 y entre 0,08 - 0,15, y en el morfotipo mendocina, entre de 0,33-0,37 y entre 0,08-0,13, respectivamente (Tabla 2). El morfotipo prichardii mostró un valor de 0,27 y 0,14. Finalmente, los tipos de asimetría cariotípica de todas las localidades analizadas se clasificaron como 1A (66,66%) y 2A (33,34 %) observándose que en los morfotipos en los que se pudo analizar más de una localidad se detectaron ambos tipos de asimetría, excepto en lanceolata que siempre presentó 1A (Tabla 2, Anexo II Ay b). Por otro lado, *C. uniflora* mostró valores de A_1 y A_2 de 0,31 y 0,08 y su tipo de asimetría cariotípica fue 1A.

4.1.5. Bando de Fluorescencia

Tanto los cuatro morfotipos de *C. polyrhiza* como *C. uniflora* presentan bandas ricas en GC ubicadas siempre en posición terminal y asociada a satélites (Fig. 3). Los morfotipos examinados presentan 1-2 pares de bandas CMA+/DAPI-. La presencia de bandas varió, observándose 1 banda por complemento haploide en el 55,55 % de los casos y 2 bandas en el restante 44,44% (Anexo II a y b).

En el morfotipo polyrhiza se encontró una sola banda siempre asociada a satélites en el cromosoma metacéntrico n°4. El porcentaje de heterocromatina en el

morfotipo polyrhiza fue de 1,69, 2,15 y 2,44 para las poblaciones de Charles Fuhr, Esquel y La Bomba, respectivamente. El morfotipo lanceolata presentó variabilidad en cuanto a la cantidad de heterocromatina y número de bandas a nivel interpoblacional e intrapoblacional. La población de Piedra del Águila fue la más estable presentando 4 bandas en todos los individuos. Dichas bandas se ubicaron en los cromosomas metacéntricos 5 y 7. La población de Telsen presentó individuos con 1 y 2 pares de bandas que se ubicaron en los cromosomas metacéntricos 3 y 3y 5, respectivamente. Por otra parte, el porcentaje de heterocromatina para Telsen fue de 3,31 mientras que para Piedra del Águila fue de 4,01 (Tabla 2). El morfotipo mendocina presentó variabilidad únicamente a nivel interpoblacional. Las poblaciones de Laguna Trolope y Lagunas de Epulafquen presentaron bandas heterocromáticas en los pares cromosómicos 3 m y 6 sm, siendo su porcentaje de heterocromatina de 3,97 y 3,74, respectivamente. La población de Lochiel presentó un único par de bandas en los cromosomas 2 m, y su porcentaje de heterocromatina fue de 2,55, mucho menor que las dos poblaciones restantes del morfotipo. El morfotipo prichardii presentó una sola banda en el par 11 metacéntrico. Su porcentaje de heterocromatina fue considerablemente más bajo que los otros morfotipos alcanzando el valor de 1,68. Por último, *C. uniflora* presentó una banda en el par 3 metacéntrico, y su porcentaje de heterocromatina fue de 1,93. .

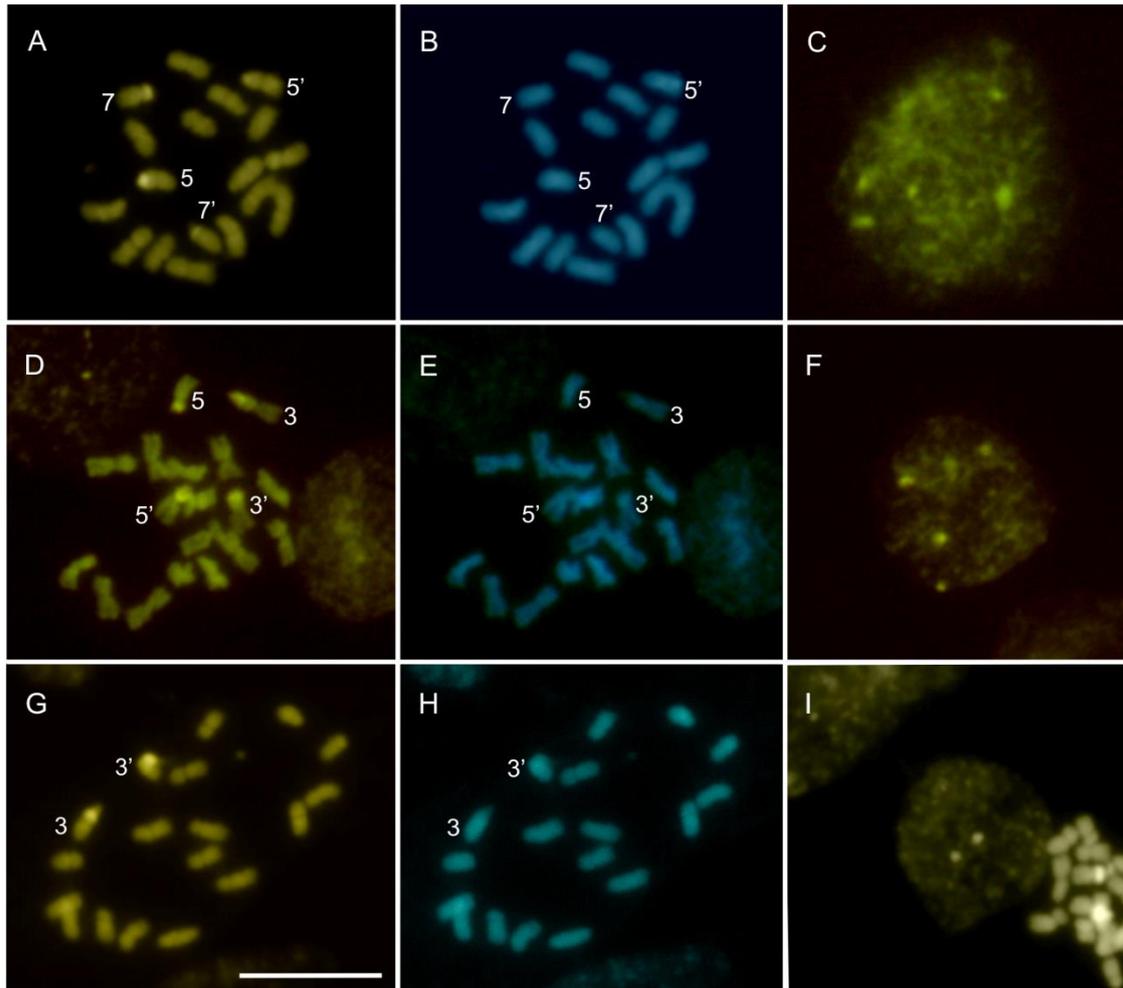


Fig. 3.1. Metafases mitóticas de *C. polyrhiza* morfotipo lanceolata ($2n = 2x = 18$) teñidas secuencialmente con CMA/DA/DAPI. **A-C:** Localidad de Piedra del Águila. **D-F:** Localidad de Telsen. Se visualizan 2 pares de NORs. **G-I:** Localidad de Telsen, 1 par de NORs. En las distintas localidades, los cromosomas homólogos con bandas heterocromáticas CMA+/DAPI- se señalan con el mismo número que en los idiogramas respectivos. La escala representa $10\mu\text{m}$.

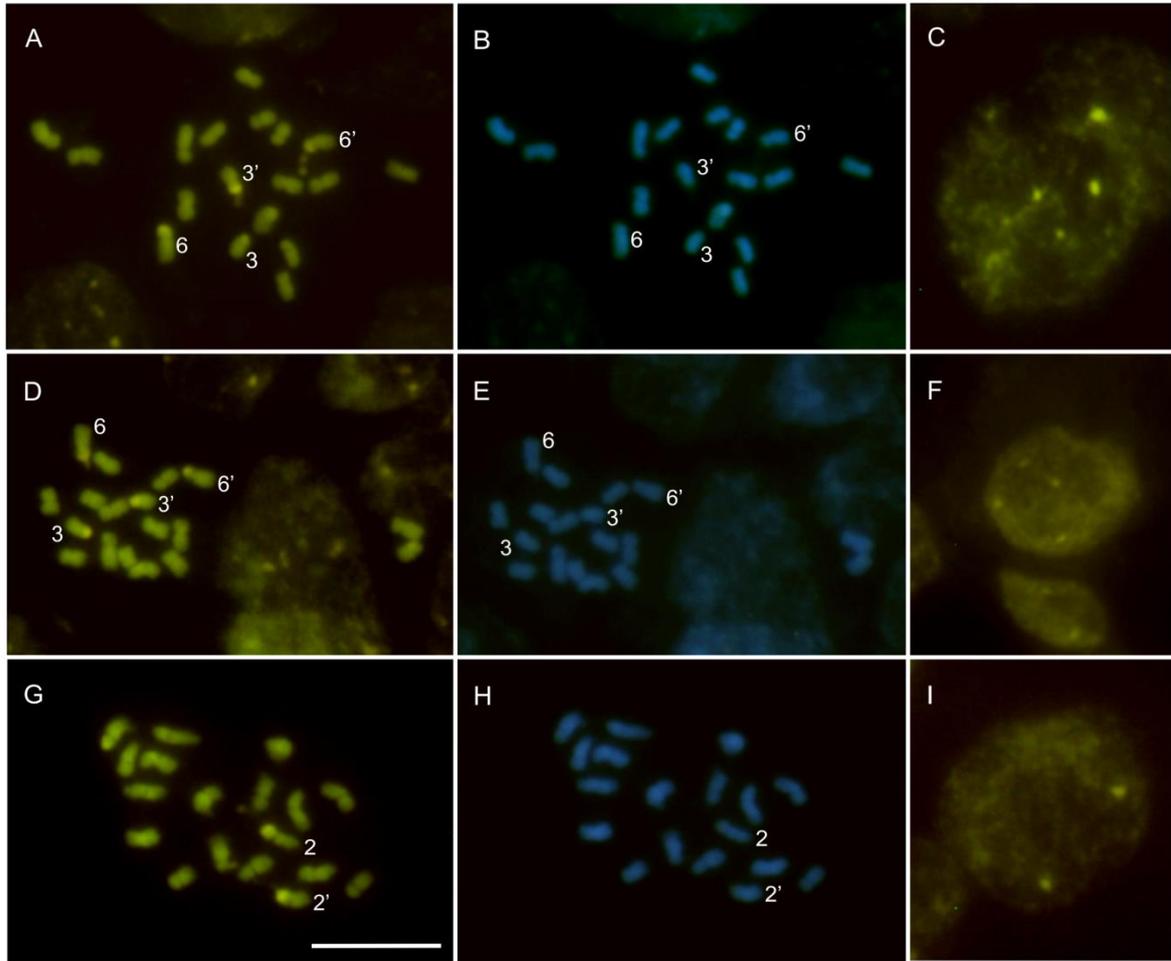


Fig. 3.2. Metafasas mitóticas de *C. polyrhiza* morfotipo mendocina ($2n = 2x = 18$) teñidas secuencialmente con CMA/DA/DAPI. **A-C:** Localidad de Laguna Trolope. **D-F:** Localidad de Lagunas Epulafquen. **G-I:** Localidad de Lochiel. En las distintas localidades, los cromosomas homólogos con bandas heterocromáticas CMA+/DAPI- se señalan con el mismo número que en los idiogramas respectivos. La escala representa $10 \mu\text{m}$.

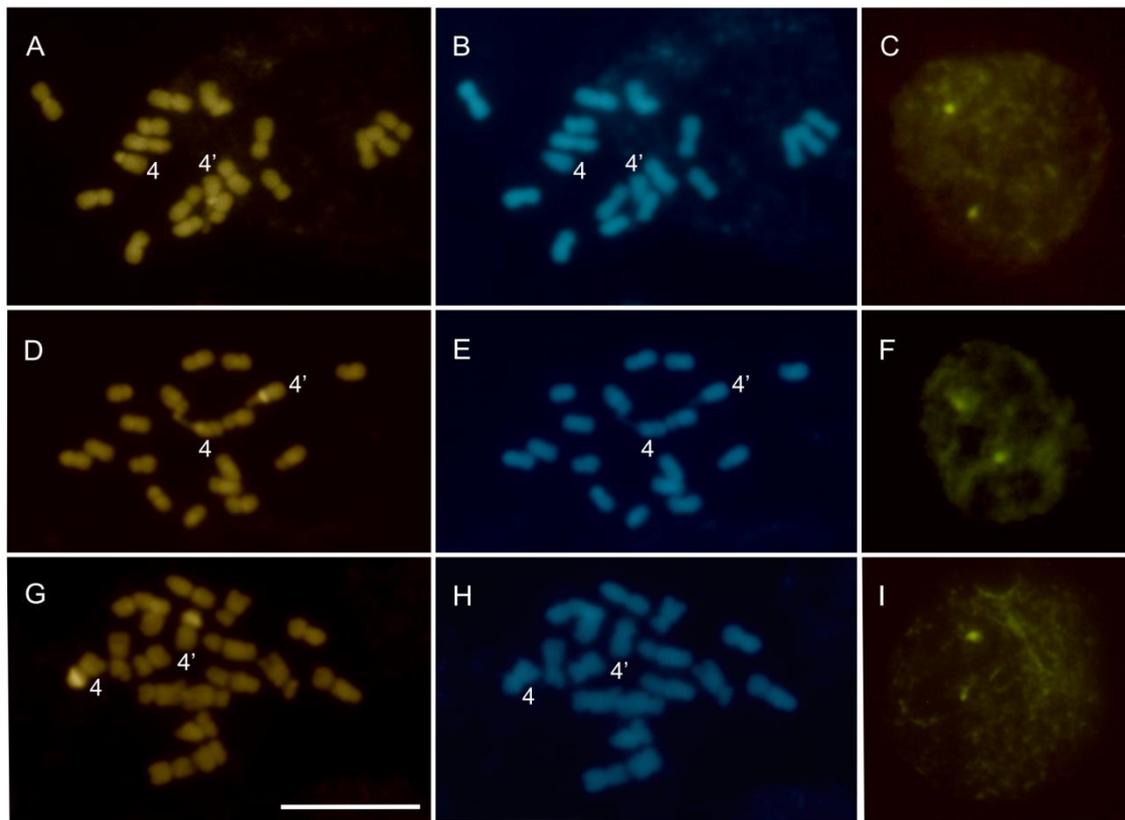


Fig. 3.3. Metafasas mitóticas de *C. polyrhiza* morfotipo polyrhiza ($2n = 2x = 18$) teñidas secuencialmente con CMA/DA/DAPI. **A-C:** Localidad de Charles Fhur. **D-F:** Localidad de Esquel. **G-I:** Localidad de La Bomba. En las distintas localidades, los cromosomas homólogos con bandas heterocromáticas CMA+/DAPI- se señalan con el mismo número que en los idiogramas respectivos. La escala representa 10 μ m.

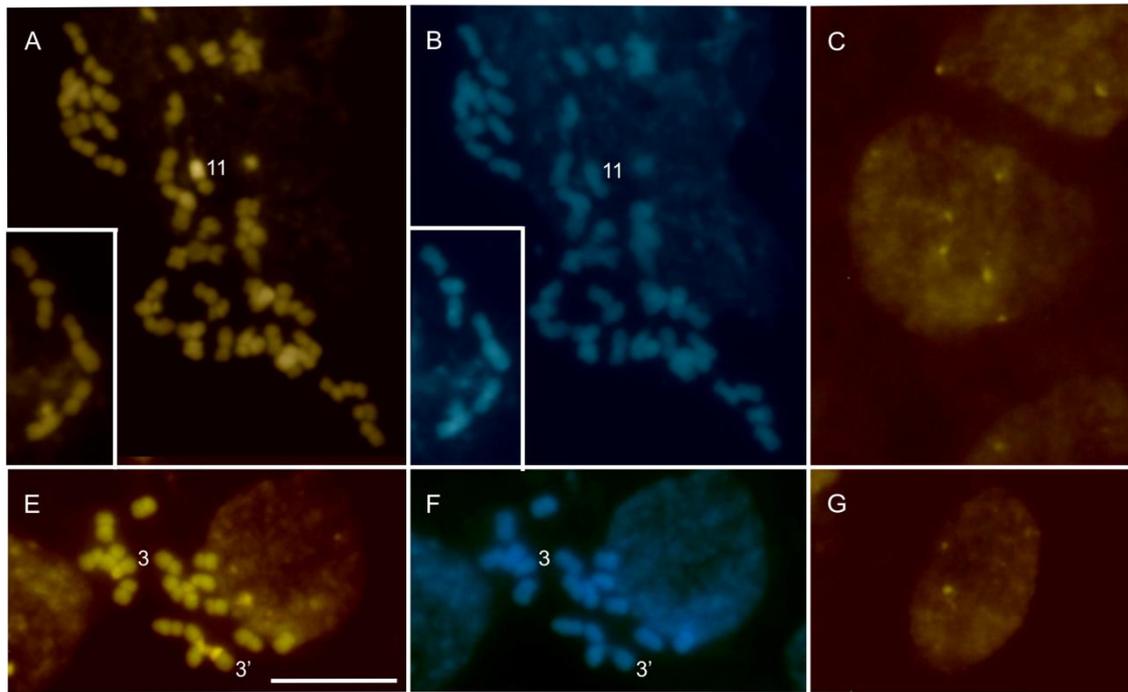
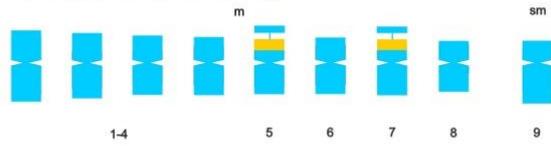


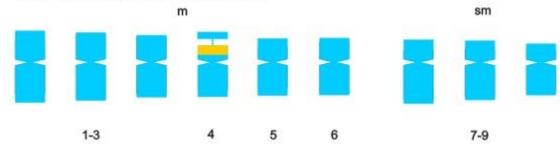
Fig. 3.4. Metafasas mitóticas de *C. polyrhiza* morfotipo *prichardii* ($2n = 6x = 54$) y *C. uniflora* ($2n = 2x = 18$) teñidas secuencialmente con CMA/DA/DAPI. **A-C:** Morfotipo *prichardii* localidad de Villa Catedral. **D-F:** *C. uniflora* localidad de Lago Burmeister. En las distintas especies, los cromosomas homólogos con bandas heterocromáticas CMA+/DAPI- se señalan con el mismo número que en los idiogramas respectivos. La escala representa $10\ \mu\text{m}$.

Calceolaria Polyrhiza CAV.

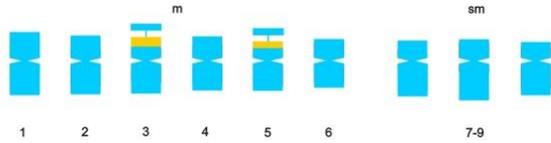
Morfotipo *lanceolata* Piedra del Águila



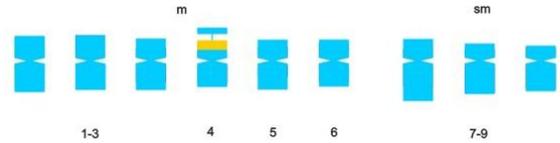
Morfotipo *polyrhiza* Charles Fuhr



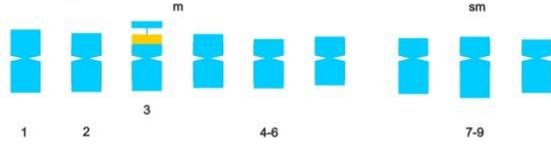
Morfotipo *lanceolata* Telsen



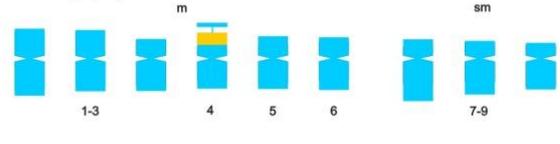
Morfotipo *polyrhiza* Esquel



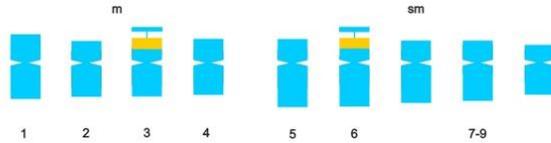
Morfotipo *lanceolata* Telsen



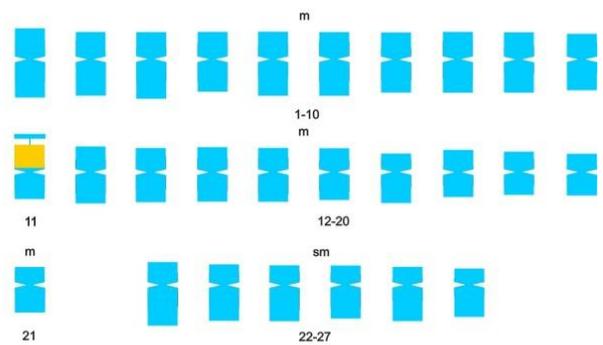
Morfotipo *polyrhiza* La Bomba



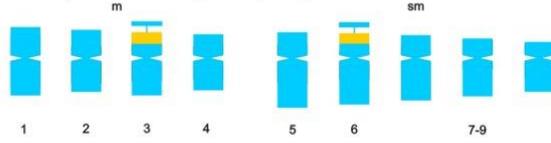
Morfotipo *mendocina* Laguna Trollope



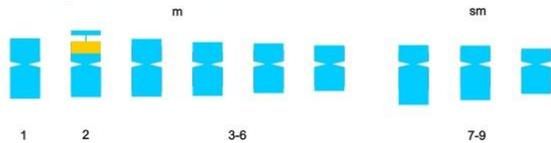
Morfotipo *prichardii* Villa Catedral



Morfotipo *mendocina* Lagunas Epulauquen



Morfotipo *mendocina* Lochiel



Calceolaria uniflora Lago Burmeister

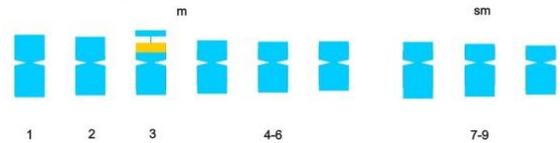


Fig.4. Idiogramas de todas las localidades analizadas del complejo *polyrhiza* y de la especie *C. uniflora*. Las localidades de *C. polyrhiza* han sido ordenadas según el morfotipo al que pertenecen. Los bloques amarillos indican la heterocromatina CMA+. En cada idiograma los cromosomas están acomodados en categorías según el índice braquial creciente y, dentro de cada grupo, de acuerdo a su longitud decreciente. Los cromosomas con similar morfología y que carecen de marcadores para su segura identificación han sido agrupados. La escala vale 5 μ m. m=metacéntrico; sm: submetacéntrico.

4.2. Análisis univariados de caracteres cromosómicos cuantitativos

Para la longitud total del complemento haploide (LTCH) se encontró diferencia significativa entre la población de Villa Catedral perteneciente al morfotipo prichardii con respecto a los morfotipos lanceolata, mendocina y polyrhiza que no difirieron entre sí ($F= 182,59$; $p<0,0001$; anexo III). Los índices braquiales (r), valor de longitud cromosómica promedio (c) y los índices de asimetría A_1 y A_2 mostraron valores sin diferencias significativas entre morfotipos ($p > 0,05$; ver anexo III).

Por otro lado, el porcentaje de heterocromatina (%HC) presentó diferencias significativas entre el morfotipo prichardii, con el menor %HC, y los morfotipos lanceolata y mendocina que registraron los mayores porcentajes de HC ($F= 7,17$; $p=0,03$). El morfotipo polyrhiza presentó un porcentaje de heterocromatina intermedio a prichardii y a los morfotipos lanceolata y mendocina, pero no se diferenció significativamente de ninguno de ellos (ver anexo III).

4.3. Análisis fenético

La codificación de los caracteres utilizados en este análisis de conglomerados se muestra en el Anexo IV. Se observa que este agrupa a las localidades estudiadas en base a su distancia, esta entendida como la disimilitud entre dos muestras. En este sentido, se obtuvieron tres grupos (Fig. 7). El grupo A se compone de las localidades de Esquel y La Bomba, pertenecientes al morfotipo polyrhiza (denominado aquí A-1), la localidad de Villa Catedral, perteneciente al morfotipo prichardii, y el grupo externo *C. uniflora*. Se destaca que la distancia entre *C. uniflora* y el grupo A-1 es menor que la distancia entre el grupo A-1 y la localidad perteneciente al morfotipo prichardii.

En el grupo B se observan dos subgrupos, B-1 conformado por las poblaciones del morfotipo lanceolata y B-2 formado por la localidad de Lochiel (morfotipo mendocina) y Charles Fuhr (morfotipo polyrhiza). Finalmente, el grupo C se compone de las localidades Lagunas Epulafquen y Laguna Trolope, que pertenecen al morfotipo mendocina. Se destaca que los grupos A y B son más similares entre ellos que con el C.

Finalmente, se observa una agrupación más o menos consistente entre los morfotipo de *C. polyrhiza*, la variabilidad cariotípica encontrada, con la salvedad del cluster B-3, se agrupa de forma no aleatoria.

4.4. Mapeo de caracteres

El mapeo de caracteres cromosómicos sobre el árbol filogenético se detalla en el Anexo V, mientras que en la figura 8 se resumen las tendencias evolutivas inferidas. Se observa que el aumento del número de NORs y de heterocromatina son sinapomórficos en los morfotipos prichardii, lanceolata y mendocina. Las localidades pertenecientes al morfotipo mendocina se caracterizan por un aumento del tamaño cromosómico y de la asimetría cromosómica. Finalmente, el morfotipo prichardii muestra un aumento en el número de cromosomas debido a la poliploidía. El cariotipo perteneciente al morfotipo polyrhiza presenta menor número de cambios cromosómicos, y habría mantenido características cariotípicas del ancestro en común con *C. uniflora*. Para este análisis, no se utilizaron los datos cariotípicos de la localidad de Lochiel debido a las grandes diferencias observadas con las demás localidades analizadas pertenecientes al mismo morfotipo.

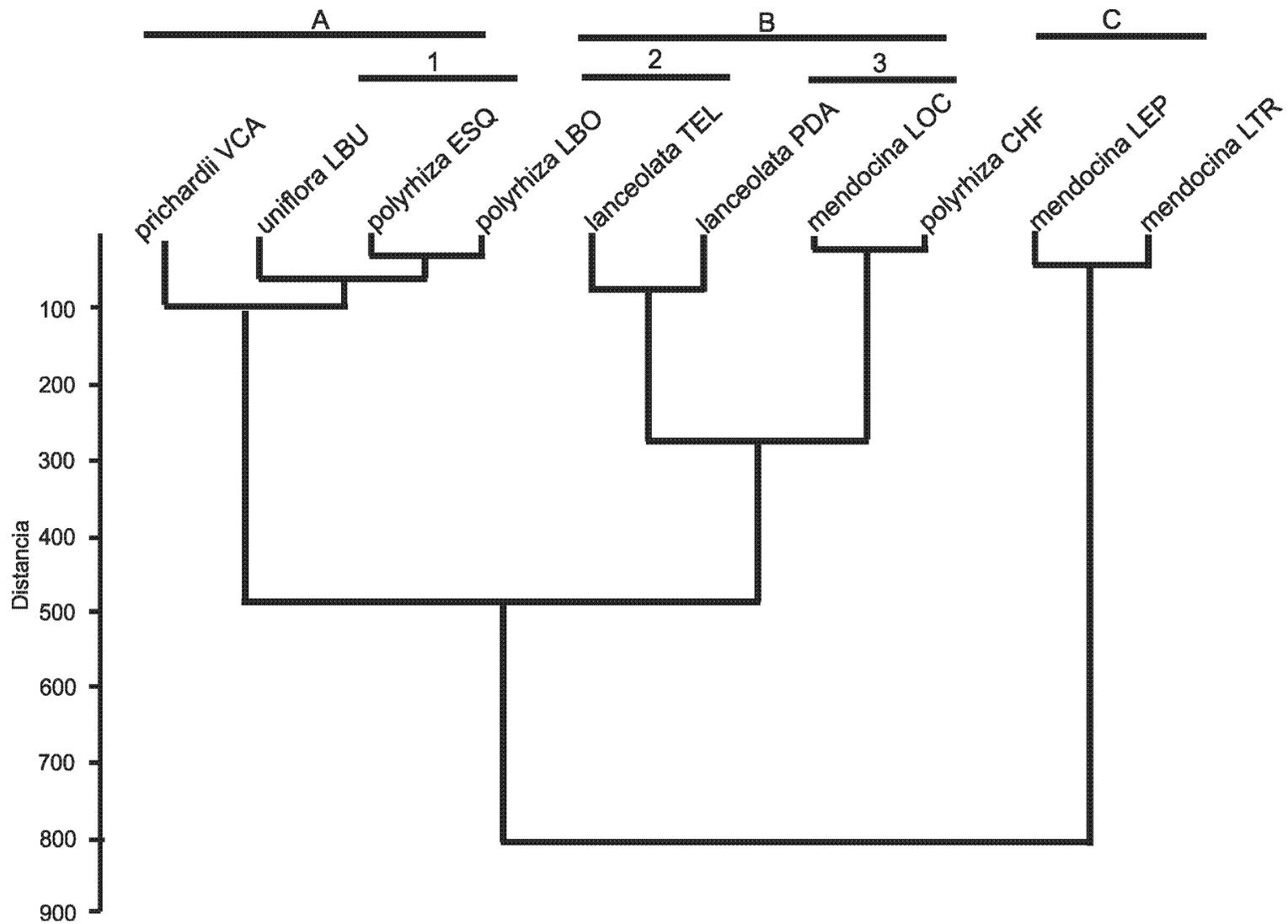


Fig.7. Fenograma UPGMA derivado de la distancia euclídea promedio entre los morfotipos de *C. polyrhiza* y *C. uniflora* utilizando datos cromosómicos. Las referencias de las poblaciones se encuentran en el texto y en la fig. 5 y 6.

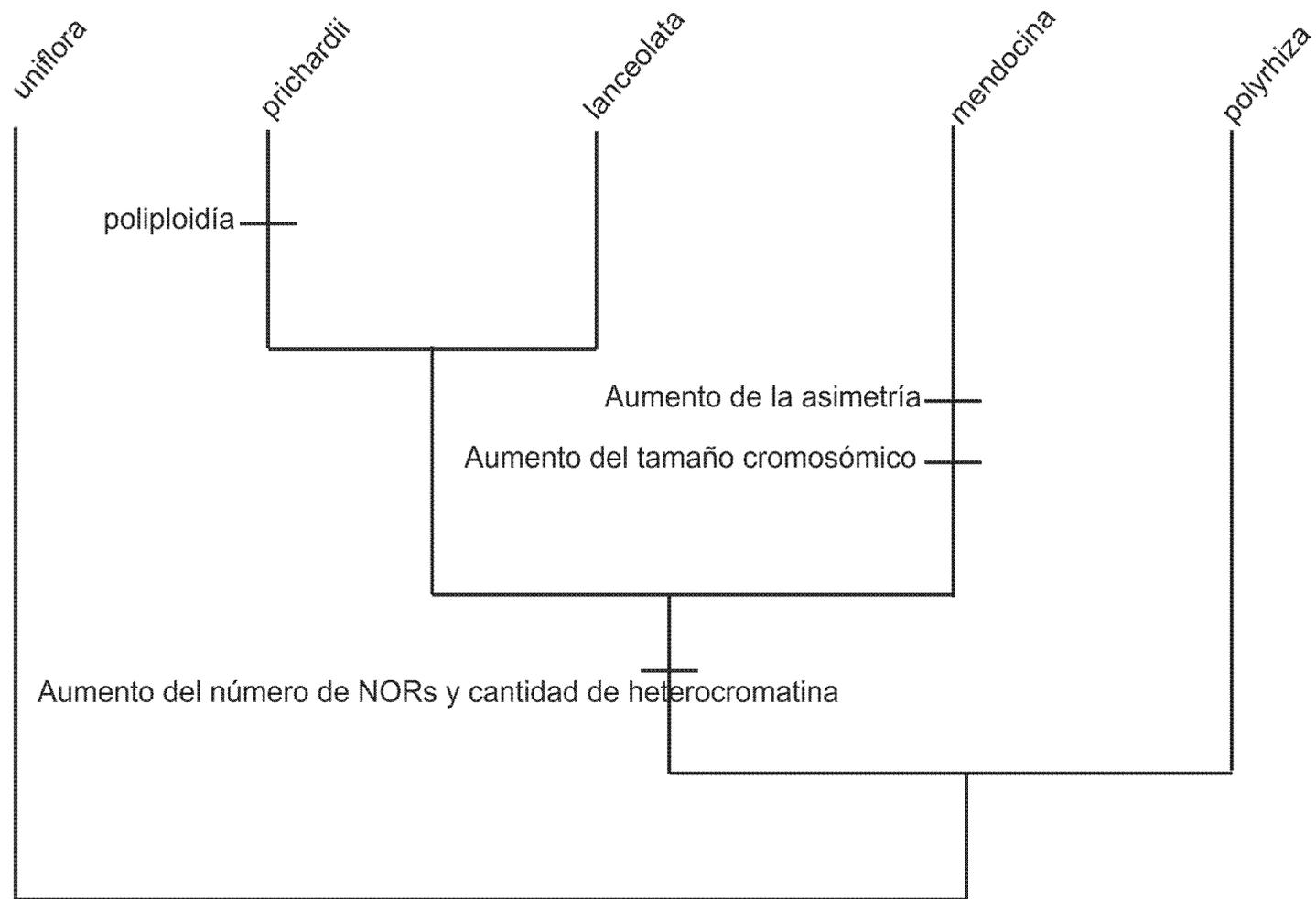


Fig.8. Árbol filogenético que muestra las relaciones entre los distintos morfotipos de *C. polyrhiza* y *C. uniflora* y el mapeo de los caracteres cromosómicos.

DISCUSIÓN

En el presente trabajo se llevó a cabo un análisis cariotípico de distintas localidades pertenecientes a los cuatro morfotipos descritos para *C. polyrhiza*. El número cromosómico $2n=2x=18$ es confirmado para la especie en general (Erhart 2000), sin embargo se destaca el hallazgo de hexaploidía ($2n=6x=54$) para las localidades pertenecientes al morfotipo *prichardii*. Además, se confirma el número cromosómico $2n=2x=18$ hallado para *C. uniflora* por Ehrhart (1997) aunque en este mismo trabajo también se reporta tetraploidía para esta misma especie. Este es el primer análisis cariotípico detallado en el género, y el primer bandeo de fluorescencia realizado, el cual permitió describir diferencias cariológicas intraespecíficas asociadas a cada uno de los morfotipos descritos para la especie.

5.1. Números cromosómicos: diploidía y poliploidía en *Calceolaria*

Los números cromosómicos dentro de las angiospermas son caracteres importantes para distinguir clados monofiléticos (Guerra 2008). Es aquí donde radica una de las tantas importancias de los estudios cromosómicos en taxones de reciente reclasificación como es el caso de la familia Calceolariaceae. En este contexto, los estudios citogenéticos en la familia Calceolariaceae son escasos hasta el momento y únicamente tratan de recuentos cromosómicos casi exclusivamente del género *Calceolaria*, siendo nulos los análisis cariotípicos detallados. Uno de los primeros trabajos fue el de Srinath (1940) el cual realizó un recuento cromosómico tanto de especies pertenecientes al sur de América como del norte. Encontró que el guarismo básico $x=9$ es el más frecuentemente extendido siendo muy frecuente la poliploidía. Uno de los trabajos más exhaustivos sobre el género fue el de Moleau (1988) que realizó nuevos recuentos cromosómicos, corrigiendo algunos números propuestos en otros trabajos, y terminó de confirmar el número básico $x=9$ para la mayoría de las especies analizadas aunque también destacó el número básico de $x=8$ para 8 especies pertenecientes a la sección *Calceolaria* que se habrían originado por aneuploidia. El presente trabajo confirma el número básico citado para el género ($x=9$) y el número cromosómico ($2n=2x=18$) registrado para *C. polyrhiza* por Ehrhart (1997). Esta autora propone además, un cariotipo “promedio” para *Calceolaria*, formado por 18 cromosomas de tamaño menor a $3 \mu\text{m}$ aproximadamente. Interesantemente, en este trabajo se registró un rango

cromosómico que varía de 3,53-1,86 μm (Tabla 2). El cromosoma más chico corresponde al par n° 26 del morfotipo *prichardii* (1,86 μm) y el más grande al par n° 1 del morfotipo *mendocina* de la población de Epulafquen (3,53 μm); estos resultados se ajustan a lo propuesto por Ehrhart (1997) afirmando que los cromosomas son muy pequeños y en muchos casos de difícil identificación.

Es novedoso para la especie, el hallazgo en el presente trabajo de poblaciones poliploides ($2n=6x=54$) que caracterizan al morfotipo *prichardii*. Moleau (1988) hace una mención especial a la distribución de la ploidía y destaca que la diploidía es poco frecuente en el norte del Neotrópico, donde predomina la tetraploidía ($2n=4x=32$) y menos frecuente la triploidía ($2n=3x=27$) (Srinath 1940, Moleau 1988). Este mismo autor también sugiere que el género se habría originado en las regiones templadas de Sudamérica, ya que la diploidía es mucho más frecuente en la zona sur del continente que en el norte (Ehrhart 1997, 2000). Sin embargo, en el estudio citogenético realizado por Ehrhart 1997 para especies de *Calceolaria* chilenas, se registró poliploidía en *C. aiseniana*, *C. biflora*, *C. filicaulis*, *C. nudicaulis* y *C. uniflora*, todas especies que viven en el cordón andino de la zona sur de la Patagonia chilena. Moleau (1988) también destaca la presencia de octoploidía ($2n=8x=72$) en la “puna” boliviana y peruana. Recientemente, el trabajo realizado por Andrada et al. (2010) también registra poliploidía en especies de *Calceolaria* del centro de Argentina, *C. lilo* es tetraploide con $2n = 4x = 32$ y *C. chelidonioides* es octoploide con $2n = 8x = 64$.

La hexaploidía fue registrada en tres localidades pertenecientes al morfotipo *prichardii* que se distribuyen en zonas altoandinas de la Patagonia Argentina, tales como, Villa Catedral, Leleque y Piltriquitron (El Bolsón). Este hallazgo es coincidente con lo reportado por Ehrhart (1997) que observó presencia de poliploidía en especies chilenas altoandinas. Así, la poliploidía podría ser un mecanismo de adaptación para la vida en la alta montaña ya que la duplicación de genes permitiría aumentar la variabilidad de alelos y esto podría promover la aparición de nuevos genes neofuncionales ventajosos (Holand y Chen, 2001; Sankoff 2001; Adams y Wendel 2005; Crow y Wagner 2006). Elliott (1958) sugiere que uno de los principales factores que contribuyeron a la formación de poliploides habrían sido los eventos de glaciaciones ocurridos, y que estaría relacionado con ventajas ecológicas de supervivencia y colonización. En este mismo sentido, Löve (1953) arguye que en lugares de elevación considerable, los poliploides son más tolerantes que los diploides

para condiciones climatológicas extremas. En otro sentido, Tabaldi (2009) investigó y ensayó experimentalmente la producción de poliploides utilizando choques térmicos. Estos choques demostraron ser el 100% eficaz para producción de organismos tetraploides. Por todo esto, los eventos glaciarios más recientes que han afectado los patrones de diversidad genética de la especie (Cosacov et al 2010) podrían haber desempeñado también un papel fundamental en la producción de poliploides de *C. polyrhiza*. De esta manera el aislamiento en refugios de altura, como propone Cosacov et al. (2010) podrían haber funcionado como pequeños “laboratorios” de producción de poliploides en los eventos glaciares más recientes. Debido a la dificultad de conseguir metafases de calidad en las tres poblaciones estudiadas, no se pudo determinar con precisión el origen auto o alopoliploide. La comparación cariotípica entre los distintos morfotipos sugiere que la población de Villa Catedral podría ser un autopoliploide del morfotipo polyrhiza ya que en las imágenes que se analizaron se observaron cromosomas CMA+ pequeños, estos cromosomas son característicos de lanceolata y polyrhiza pero lanceolata también posee cromosomas CMA+ grandes y deberían haberse evidenciado en alguna metafase. Estudios citogenéticos utilizando hibridización *in situ* de sondas fluorescentes (FISH) podrían echar luz a esta incógnita y caracterizar de forma más certera estos citotipos poliploides. La poliploidía en general tiene múltiples orígenes (Leitch y Bennett, 1997; Soltis y Soltis 1999); en este sentido, la población de Villa Catedral podría tener una formación particular que no necesariamente es la misma que la poliploidía que podría presentar este morfotipo en otras poblaciones.

5.2. Bando de fluorescencia: variación cariotípica entre los morfotipos

El uso de fluorocromos base-específicos para la tinción de los cromosomas permite caracterizar las bandas heterocromáticas de acuerdo a la composición de su ADN (Schweizer, 1980). Así, la tinción con CMA/DA/DAPI demuestra que todas las especies y morfotipos analizados en este trabajo tienen heterocromatina rica en pares de bases GC, ya que exhiben bandas brillantes con CMA y apagadas con DAPI, distribuidas en bandas terminales ubicadas en los brazos cortos de cromosomas metacéntricos y submetacéntricos. Este tipo de heterocromatina está asociada a las NORs como es característico en plantas (Sinclair & Brown, 1971) y permitió analizar más

detalladamente el complemento cromosómico de cada uno de los morfotipos. Los bandeos con fluorocromos específicos demuestran ser herramientas de análisis más útiles y poderosas que las técnicas clásicas de tinción ya que permiten poner de manifiesto cierta variabilidad cariotípica relacionada a la composición de las bases nitrogenadas del ADN, que de otra manera sería ignorada. Así, el análisis de la estructura interna de los cromosomas permitió definir marcadores cromosómicos específicos para cada uno de los morfotipos.

Estos son:

- 1) La presencia de dos pares de organizadores nucleolares CMA+, uno de ellos en cromosoma submetacéntrico en el morfotipo mendocina.
- 2) La presencia de dos pares de organizadores nucleolares CMA+ en cromosomas metacéntricos en el morfotipo lanceolata.
- 3) La presencia de un único par de organizadores nucleolares CMA+ en cromosoma metacéntrico del morfotipo polyrhiza.

De acuerdo al mapeo de caracteres realizado sobre la filogenia, la presencia de una banda por complemento haploide sería ancestral a la presencia de dos bandas por complemento. La duplicación y redistribución de la heterocromatina podrían ser los mecanismos por los cuales los cariotipos mutaron estructuralmente y adquirieron sus características distintivas. Este tipo de mutaciones han sido bien documentadas en muchos organismos y en particular en varias familias de plantas e incluso son discutidos como motores de la evolución de los organismos junto con el aislamiento reproductivo (Stebbins 1971; King 1993; Livingstone y Rieseberg 2003; Dobigny et al. 2005).

Dos de las tres poblaciones estudiadas del morfotipo mendocina pueden ser caracterizadas por la presencia de dos pares de organizadores nucleolares CMA+, uno de ellos en un cromosoma submetacéntrico. Estas localidades se encuentran en las provincias de Neuquén y Chubut y pertenecen a los haplocados Patagonia Norte, Alto-Andino Norte y Alto-Andino Sur según Cosacov et al. (2010). Según el trabajo filogeográfico de la especie (Cosacov et al. 2010), estos linajes genéticos, a excepción de Lochiel (Chubut), habrían divergido del resto de las variantes genéticas encontradas en *C. polyrhiza* en el Mioceno tardío (13-7 millones de años atrás) probablemente debido al levantamiento de la Cordillera de los Andes, que habría producido el

aislamiento de esas poblaciones (Cosacov et al. 2010). Este morfotipo presenta flores con la garganta sin manchas, elaióforos con pelos glandulares (Strelin 2009) y tiene la particularidad de poseer garganta de distancia operativa corta, lo que posibilita que la pequeña abeja colectora de aceites *Chalepogonus caerulussea* un polinizador efectivo, lo que sería un rasgo que podría haber contribuido al aislamiento reproductivo de este morfo ya que en los morfotipos de garganta larga como lanceolata y polyrhiza, este polinizador no toca las piezas fértiles (Cosacov et al. 2014; Sosa Pivatto et al. 2016). El caso de los ejemplares de Lochiel es destacable ya que previo a los estudios de Strelin et al. (2013) dichos individuos no podían ser clasificados en uno de los morfotipos. Esta autora valiéndose de caracteres florales y foliares cualitativos y cuantitativos clasificó a dicha población como morfotipo mendocina, si bien la localidad está muy distante del área de distribución propuesta originalmente este morfotipo. Los datos citogenéticos obtenidos para esta población indican que estaría más relacionada al morfotipo polyrhiza ya que poseen la misma fórmula cariotípica, mismo número de bandas y similar proporción de heterocromatina. Es por ello, que no fue considerada en el mapeo de caracteres y se necesitaría realizar un estudio más detallado de la morfología floral y cromosómica de varios individuos de la población, ya que podría tratarse de una convergencia morfológica cuyo origen serían poblaciones del morfotipo polyrhiza. Además, es interesante mencionar que la secuenciación de regiones del ADN cloroplastidial mostraron que la población de Lochiel estaría más relacionada al morfotipo polyrhiza y lanceolata que al resto de las localidades del morfotipo mendocina, confirmando los resultados encontrados en el presente trabajo.

Los cariotipos obtenidos para las distintas localidades pertenecientes al morfotipo lanceolata también diferenciaron a este morfotipo del resto. Sin embargo, el estudio filogeográfico desarrollado por Cosacov et al. (2010) no encontró en estas poblaciones haplotipos diferentes a los hallados para los morfotipos polyrhiza y prichardii, ya que la mayoría de las localidades estudiadas de estos morfotipos presentaron el haplotipo más distribuido H1 perteneciente al haploclado Patagonia Norte. Esto puede deberse a que estos morfotipos se han separado en épocas más recientes y por lo tanto no habría transcurrido tiempo suficiente para su suficiente diferenciación, o que exista un flujo génico entre morfotipos. El hecho de que estos morfotipos compartan el haplotipo ancestral del complejo, es una evidencia que respaldaría la primera alternativa. Sin embargo, el flujo génico entre morfotipos también

sería posible ya que lanceolata y polyrhiza si bien poseen flores con distinto patrón de manchas en la garganta, ambos tienen elaióforos de morfología similar (Strelin 2009) y flores con distancia operativa larga que depositan su polen en la zona notocéflica (Cosacov et al. 2014). Estos morfotipos comparten a *Centris cineraria* como polinizador, lo que permitiría la existencia de flujo génico entre ellos. En efecto se ha observado a dichos morfotipos en simpatria en diversas localidades. La población de Charles Fuhr morfotipo polyrhiza es la que posee comparativamente menor heterocromatina que las poblaciones de distribución más norte y centro del complejo *C. polyrhiza*. Esta localidad no fue estudiada con secuencias de ADN de cloroplastos, sin embargo, de acuerdo a la zona geográfica donde se ubica estaría más relacionada al haplotipo Patagonia Sur que podría estar indicando una cierta diferenciación (Cosacov et al. 2010).

El morfotipo prichardii no presentó marcadores cromosómicos diferenciales con la técnica de bandeado cromosómico, pero las tres localidades analizadas fueron poliploides, siendo entonces la poliploidía la característica cariotípica distintiva del morfotipo. La heterocromatina de la localidad de Villa Catedral solo se localizó en una banda muy grande. Un posible mecanismo para el origen de esta gran banda es el apareamiento asimétrico seguido de recombinación en un homocigota para la duplicación de la banda. Este mecanismo fue investigado para la mutación “ojos en forma de barra” de *Drosophila melanogaster* (Bridges 1936) y podría explicar porque toda la heterocromatina se encuentra en un homólogo de forma tan particular. Las otras dos poblaciones que se analizaron (Anexo VI) no presentaron la heterocromatina de la misma manera que Villa Catedral y esto es interesante ya que nos muestra que en las meiosis podrían existir rearrreglos diferenciales. Debido a la baja calidad de las metafases obtenidas en los individuos analizados no se pudo determinar el origen de la poliploidía, es decir, si sería un poliploide derivado de lanceolata o polyrhiza, pero se puede asegurar, ya que carece de cromosomas submetacéntricos con NOR, que no sería derivado de mendocina. El hecho que posee garganta corta como mendocina y que comparte el mismo polinizador, pero no comparte las características cromosómicas ni los haplotipos, podríamos sugerir que habría una convergencia fenotípica entre ambos morfotipos como fue propuesto por Sosa Pivatto et al. (2017). El morfotipo prichardii habría evolucionado en estos nuevos ambientes andinos, proveniente de poblaciones del complejo *C. polyrhiza* del este, durante épocas glaciarias donde habría desarrollado la

poliploidía como estrategia evolutiva y comenzado a interactuar con su nuevo polinizador que promovió la diferenciación y el aislamiento reproductivo. Otra posibilidad es que el morfotipo *prichardii* es una consecuencia de la mayor diversidad de genes presentes en el complemento cromosómico poliploide hecho que podría explicar el mayor tamaño de las flores y las manchas en las gargantas encontradas por Strelin (2009). Este morfotipo es polinizado tanto por *Centris cineraria* como *Chalepogonus caerulus* (Cosacov et al. 2009) y en este contexto el ajuste a los dos polinizadores podría ser otra característica brindada por la poliploidia. Finalmente, al analizar el cariotipo de *C. uniflora* y *C. polyrhiza* morfotipo *polyrhiza* podemos ver muchas similitudes tanto cualitativas como cuantitativas; esto sumado al hecho de encontrar tetraploidia en *C. uniflora* podría explicar la gran cantidad de híbridos interespecíficos encontrados de forma natural en las zonas de solapamiento de distribución (Sérsic et al. 2001).

CONCLUSIONES

Para finalizar podemos decir que las diferencias encontradas en el número cromosómico, la cantidad de heterocromatina y el patrón de bandeo fluorescente permitió identificar a cada morfotipo estudiado y esta diferenciación concuerda con lo analizado por Strelin et al. 2013. Así, los datos cariotípicos y morfológicos proporcionan cierto argumento a lo sugerido por Descole y Borsini (1954) y Correa (1999) que el complejo *C. polyrhiza* no aparenta ser una entidad biológica única. El hecho que el morfotipo *mendocina* pertenece a un linaje genético que divergió a finales del Mioceno del resto de las localidades de *C. polyrhiza* conocidas, y presenta características morfológicas y cariotípicas distintivas, argumentan a favor de reconsiderar a este morfotipo como una especie distinta. Los morfotipos *lanceolata*, *polyrhiza* y *prichardii* si bien presentan características morfológicas y cariotípicas, comparten o forman parte del mismo linaje genético, lo cual podría reflejar que estarían en los comienzos de una incipiente especiación. Estudios futuros que analicen conjuntamente la información cariotípica y filogeográfica, nos permitirán avanzar en la comprensión de los procesos evolutivos subyacentes en este complejo especies endémico de Patagonia.

AGRADECIMIENTOS

Quería agradecer a mi familia (mamá, papá, abuelos, sobrino, primos, tíos y tías) por el apoyo constante en todas las dimensiones de la vida. A Olinda Wasilcov por su amor y confianza en mi persona. A mi hermano y su compañera Andrea Casas por darme una de las mayores alegrías de la vida, Benicio Mermoud. A todos mis amigos y amigas que supieron sacarme una sonrisa en algún momento de mi vida. A los biólogos Marco Flamini, Carlos Ibarra y José Sánchez por las ayudas académicas y espirituales brindadas a mi persona. A la gente del Laboratorio de Ecología Evolutiva y Biología Floral por su ayuda, mates y charlas. Por último, quiero hacer una mención especial a las Doctoras Cristina Acosta, Alicia Sersic y Andrea Cosacov por sus ayudas y apoyo en todos los momentos de dudas, incertezas y alegrías en el transcurso de esta investigación.

BIBLIOGRAFIA

Acosta, M.C., Guerra, M., Moscone, E.A. (2012). Karyological relationships among some South American species of *Solanum* (Solanaceae) based on fluorochrome banding and nuclear DNA amount. *Plant Systematics and Evolution*, 298(8).1547-1556.

Andrada, A.R., Lozzia, M.E. y Cristóbal, M.E. (2010). Citogenética y rehabilitación de *Calceolaria lilo* Descole & Borsini (Calceolareaceae) *Lilloa*, 47 (1-2), 10-16.

Barros e Silva, A., & Guerra, M. (2010). The meaning of DAPI bands observed after C-banding and FISH procedures. *Biotechnic & Histochemistry*, 85(2), 115-125.

Bowen, C. C. (1956). Freezing by liquid carbon dioxide in making slides permanent. *StainTechnol*, 31, 87-90.

Bridges, C. B. (1936). The bar" gene" a duplication. *Science*, 83(2148), 210-211.

Chalup, L., Grabiele, M., Solís Neffa, V., & Seijo, G. (2012). Structural karyotypic variability and polyploidy in natural populations of the South American *Lathyrus nervosus* Lam.(Fabaceae). *Plant systematics and evolution*, 298(4), 761-773.

Correa, M. N. (1999). Flora patagónica. Parte IV Dicotyledoneas. Gamopétalas (Ericaceae a Calyceraceae), Colección Científica del INTA. Buenos Aires, 536pp.

Cosacov, A., Sérsic, A. N., Sosa, V., De-Nova, J. A., Nylinder, S., Cocucci, A. A. (2009). New insights into the phylogenetic relationships, character evolution, and phytogeographic patterns of *Calceolaria* (Calceolariaceae). *American journal of botany*, 96(12), 2240-2255.

Cosacov, A., Sérsic, A. N., Sosa, V., Johnson, L. A., & Cocucci, A. A. (2010). Multiple periglacial refugia in the Patagonian steppe and post-glacial colonization of the Andes: the phylogeography of *Calceolaria polyrhiza*. *Journal of Biogeography*, 37(8), 1463-1477.

Cosacov, A., Cocucci, A.A ., Sérsic, A. N. (2012). Variación geográfica de la recompensa floral de *Calceolaria polyrhiza* (Calceolariaceae): Influencia de factores bióticos y abióticos. *Bol.Soc.Argent. Bot*, 47(3-4), 363–373.

Cosacov, A., Cocucci, A. A., & Sérsic, A. N. (2014). Geographical differentiation in floral traits across the distribution range of the Patagonian oil-secreting *Calceolaria polyrhiza*: do pollinators matter? *Annals of Botany*, 113(2), 251–66. doi:10.1093/aob/mct239

Crisci, J. V., Lopez Armengol, M. F. (1983). Introducción a la teoría y práctica de la Taxonomía Numérica. OEA, Washington.

Crow, K.D. y Wagner, G.P. (2006). What is the role of genome duplication in the evolution of complexity and diversity?. *Molecular Biology and Evolution*, 23: 887-892.

Descole, H, Borsini, O. (1954). Scrophulariaceae. En: Descole H, ed. Genera et species plantarum argentinorum. Tucumán: Guillermo Kraft, V, I: 1–167.

Di Rienzo, J. A., Balzarini, M., Casanoves, F., Gonzalez, L., Tablada, M., Guzmán, W., & Robledo, C. W. (2002). InfoStat versión 1.1. *Grupo InfoStat, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina*.

Dobigny, G., Aniskin, V., Granjon, L., Cornette, R., & Volobouev, V. (2005). Recent radiation in West African Taterillus (Rodentia, Gerbillinae): the concerted role of chromosome and climatic changes. *Heredity*, 95(5), 358-368.

Ehrhart, C. (1997). Zur Cytologie chilenischer *Calceolaria* Arten (Scrophulariaceae). *Sendtnera*, 4, 41-59.

Ehrhart, C. (2000). Die Gattung *Calceolaria* (Scrophulariaceae) in Chile. *Bibliotheca Botanica*, 153, 1–283.

Ehrlich, J. Sankoff, D., Nadeau, J.H. (1997). Synteny conservation and chromosome rearrangement during mammalian evolution. *Genetics*, 147;289-296.

Elliott, F. C. (1958). Plant breeding and cytogenetics. *Plant breeding and cytogenetics*.

Falcao, D.Q., Costa, E.R., Alviano, D.S., Alviano, C.S., Kuster, R.M., Menezes, F.S. (2006). Atividade antioxidante e antimicrobiana de *Calceolaria chelidonioides* Humb. Bonpl Kunth Br J. *Pharmacog*, 16(1), 73–76.

Guerra, M. (2000). Patterns of heterochromatin distribution in plant chromosomes. *Genetics and molecular biology*, 23(4), 1029-1041

Guerra, M. (2008). Chromosome numbers in plant cytotaxonomy: concepts and implications. *Cytogenetic and genome research*, 120(3-4), 339-350.

Guerra, M. (2012). Cytotaxonomy: the end of childhood. *Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, 146(3), 703-710.

Hammer, Ø., Harper, D.A.T., y Ryan, P.D. (2001). PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Paleontologia Electronica* 4 (1): 9pp. http://paleo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm

Holland, D.N., y Chen, J. (2001). Origin and early evolution of the vertebrates: New insights in molecular biology, anatomy and paleontology. *Bioessays*, 23:142-151.

Khambay, B.P.S., Batty, D., Cahill, M., Denholm, I., Mead-Briggs, M., Vinall, S., Niemeyer, H.M., Simmonds, M.S.J. (1999). Isolation, characterization, and

biological activity of naphthoquinones from *Calceolaria andina* L. *J Agric Food Chem*, 47(2), 770–775.

King, M. (1995). *Species evolution: the role of chromosome change*. Cambridge University Press.

Leitch, I. J., & Bennett, M. D. (1997). Polyploidy in angiosperms. *Trends in plant science*, 2(12), 470-476.

Levan, A., Fredga, K., & Sandberg, A. (1964). Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas*, 52(2), 201–220.

Löve, Á. (1953). Subarctic polyploidy. *Hereditas*, 39(1-2), 113-124.

Maddison, W. P., and Maddison, D. R. (2007). Mesquite: A modular system for evolutionary analysis, version 2.0 [online program, documentation]. Website <http://mesquiteproject.org>

Molau, U. (1988). Organization for flora neotropica. *Brittonia*, 47, 1–325.

Neffa, V. G. S., & Fernandez, A. (2001). Cytogeography of the South American *Turnera sidoides* L. complex (Turneraceae, Leiocarpace). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 137(2), 189-196.

Olmstead, R. G., & Reeves, P. A. (1995). Evidence for the polyphyly of the Scrophulariaceae based on chloroplast *rbcL* and *ndhF* sequences. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 176-193.

Olmstead, R. G., Wolfe, A. D., Young, N. D., Elisons, W. J., & Reeves, P. A. (2001). Disintegration of the Scrophulariaceae. *American Journal of Botany*, 88(2), 348-361.

Rieseberg, L. H., & Livingstone, K. (2003). Chromosomal speciation in primates. *Science*, 300(5617), 267-268.

Sankoff, D. (2001). Gene and genome duplication. *Current Opinion in Genetics and Development*, 11: 681-684.

Scaldfarferro, M., Chiarini, F., Santiñaque, F. F., Bernardello, G., & Moscone, E. A. (2012). Geographical pattern and ploidy levels of the weed *Solanum elaeagnifolium* (Solanaceae) from Argentina. *Genetic resources and crop evolution*, 59(8), 1833-1847.

Schwarzacher, T., Ambros, P., Schweizer, D. (1980). Application of Giemsa banding to orchid karyotype analysis. *Plant Systematic and Evolution*, 134, 293-297.

Schweizer, D. (1976). Reverse fluorescent chromosome banding with chromomycin and DAPI. *Chromosoma*, 58(4), 307-324.

Schweizer, D. (1980). Simultaneous fluorescent staining of R bands and specific heterochromatic regions (DA-DAPI bands) in human chromosomes. *Cytogenetic and Genome Research*, 27(2-3), 190-193.

Schweizer, D. (1981). Counterstain-enhanced chromosome banding. *Human Genet.* 57, 1-14.

Sérsic, A. N., Mascó, M., & Noy-Meir, I. (2001). Natural hybridization between species of *Calceolaria* with different pollination syndromes in southern Patagonia, Argentina. *Plant Systematics and Evolution*, 230(1), 111-124.

Sérsic, A.N. (2004). Pollination biology in the genus *Calceolaria* L.(Calceolariaceae). *Stapfia*, 82, 1–121. Retrieved from www.biologiezentrum.at

Siljak-Yakovlev, S., & Peruzzi, L. (2012). Cytogenetic characterization of endemics: past and future. *Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, 146(3), 694-702.

Sinclair, J. H., & Brown, D. D. (1971). Retention of common nucleotide sequences in the ribosomal deoxyribonucleic acid of eukaryotes and some of their physical characteristics. *Biochemistry*, 10(14), 2761-2769.

Sneath, P. H. A., Sokal, R. R. (1973). Numerical Taxonomy: The Principles and Practice of Numerical Classification. W. H. Freeman, San Francisco.

Srinath, K. (1940). Morphological and Cytological Studies in the Genus *Calceolaria*. *Cytologia*, 77(1), 104–134. doi:10.1007/BF01739885

Stebbins, G. L. (1971). Chromosomal evolution in higher plants. E. Arnold Publ., London.

Strelin, M.M. (2009). *Estudio del polimorfismo de Calceolaria polyrhiza Cav. utilizando caracteres morfológicos cualitativos y cuantitativos.* (Tesis de grado). Facultad de Ciencia Exactas Físicas y Naturales Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba Capital.

Strelin, M.M., Cosacov, A., Diller, M., Sérsic, A. N. (2013). Study of the polymorphism of the Patagonian *Calceolariapolyrhiza* (Calceolariaceae) using decision tree and sequential covering rule induction. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 173, 487-500

Sokal, R. R., Rohlf, F. J. (1995). Biometry. 3rd ed. Freeman & Co., New York.

Soltis, D. E., & Soltis, P. S. (1999). Polyploidy: recurrent formation and genome evolution. *Trends in Ecology & Evolution*, 14(9), 348-352.

Sosa-Pivatto, M., Cosacov, A., Baranzelli, M. C., Iglesias, M. R., Espíndola, A., & Sérsic, A. N. (2017). Do 120,000 years of plant–pollinator interactions predict floral phenotype divergence in *Calceolaria polyrhiza*? A reconstruction using species distribution models. *Arthropod-Plant Interactions*, 11(3), 351-361.

Souza, L. G. R., Crosa, O., Speranza, P., & Guerra, M. (2012). Cytogenetic and molecular evidence suggest multiple origins and geographical parthenogenesis in *Nothoscordum gracile* (Alliaceae). *Annals of botany*, 109(5), 987-999.

Tebaldi, P. C., & Oceanógrafa, U. N. I. V. A. L. I. (2009). Produção de tetraplóides de tilápia do nilo (*Oreochromis niloticus*) através da aplicação de choque. *REDVET*, 10(10).

Urdampilleta, J., Amat, A., & Bidau, C. (2005). Karyotypic studies and morphological analysis of some reproductive features in five species of *Conyza* (Astereae: Astereaceae) from northeastern Argentina. *Bol Soc Arg Bot*, 40, 91-99.

Vandana, & Chaudhary, B. R. (2013). Intervarietal karyotypic variation in *Vicia faba* L. *Caryologia*, 66(1), 6-11.

Vogel, S. P. (1974). Ölblumen und ölsammelnde Bienen. *Tropische und Subtropische Pflanzenwelt*, 7, 1–267.

Woldemichael, G.M., Waechter, G., Singh, M.P., Maiese, W.M., Timmermann, B.N. (2003). Antibacterial diterpenes from *Calceolaria pinifolia*. *J Nat Prod*, 66(2), 242–246.

Zarco, C. R. (1986). A new method for estimating karyotype asymmetry. *Taxon*, 526-530.

Zuolaga, F.O. y Morrone, O. (1999). Catálogo de las Plantas Vasculares de la República Argentina II. Acanthaceae- Euphorbiaceae (Dicotyledoneae). Missouri Botanical Garden Press. Missouri, USA.

ANEXOS

Anexo I - Datos cromosómicos de cada localidad analizada

<i>C. polyrhiza</i> morfotipo lanceolata Piedra Del Águila						
Par	s	l	c	r	% de LTCH	n
1	1,46+/-0,26	1,77+/-0,23	3,23+/-0,48	1,21+/-0,11	13,35	m
2	1,34+/-0,23	1,59+/-0,27	2,93+/-0,49	1,19+/-0,08	12,13	m
3	1,21+/-0,33	1,46+/-0,38	2,68+/-0,7	1,21+/-0,1	11,09	m
4	1,15+/-0,21	1,46+/-0,18	2,62+/-0,38	1,26+/-0,11	10,82	m
5	1,14+/-0,25	1,42+/-0,22	2,56+/-0,44	1,25+/-0,19	10,60	m
6	1,12+/-0,19	1,40+/-0,22	2,53+/-0,38	1,25+/-0,15	10,46	m
7	1,05+/-0,16	1,46+/-0,27	2,51+/-0,38	1,40+/-0,26	10,39	m
8	1,00+/-0,24	1,29+/-0,14	2,29+/-0,35	1,29+/-0,28	9,48	m
9	0,99+/-0,1	1,83+/-0,23	2,82+/-0,31	1,85+/-0,16	11,67	sm

<i>C. polyrhiza</i> morfotipo lanceolata Telsen						
Par	s	l	c	r	% de LTCH	n
1	1,29+/-0,13	1,57+/-0,17	2,86+/-0,28	1,21+/-0,09	12,95	m
2	1,14+/-0,13	1,52+/-0,14	2,66+/-0,23	1,34+/-0,15	12,06	m
3	1,09+/-0,15	1,42+/-0,21	2,51+/-0,29	1,31+/-0,24	11,36	m
4	1,10+/-0,13	1,33+/-0,13	2,43+/-0,2	1,21+/-0,16	11,03	m
5	0,87+/-0,15	1,35+/-0,11	2,22+/-0,24	1,56+/-0,26	10,07	m
6	0,97+/-0,11	1,22+/-0,15	2,19+/-0,24	1,26+/-0,11	9,94	m
7	0,91+/-0,1	1,61+/-0,29	2,52+/-0,35	1,76+/-0,3	11,49	sm
8	0,86+/-0,12	1,60+/-0,26	2,46+/-0,36	1,85+/-0,21	11,12	sm
9	0,74+/-0,13	1,46+/-0,16	2,20+/-0,27	1,97+/-0,28	9,97	sm

<i>C. polyrhiza</i> morfotipo mendocina Laguna Trolope						
Par	s	l	c	r	% de LTCH	n
1	1,27+/-0,17	1,63+/-0,2	2,91+/-0,34	1,28+/-0,15	11,79	m
2	1,17+/-0,11	1,54+/-0,16	2,71+/-0,24	1,310,14+/-	10,98	m
3	1,09+/-0,1	1,53+/-0,13	2,62+/-0,2	1,40+/-0,11	10,62	m
4	1,08+/-0,14	1,47+/-0,21	2,54+/-0,33	1,36+/-0,13	10,32	m

5	1,07+/-0,14	2,10+/-0,22	3,17+/-0,35	1,97+/-0,13	12,85	sm
6	1,12+/-0,19	1,98+/-0,28	3,10+/-0,46	1,77+/-0,16	12,56	sm
7	1,00+/-0,13	1,80+/-0,18	2,80+/-0,27	1,80+/-0,19	11,34	sm
8	0,91+/-0,12	1,66+/-0,18	2,57+/-0,29	1,83+/-0,15	10,42	sm
9	0,81+/-0,07	1,44+/-0,17	2,25+/-0,21	1,79+/-0,16	9,13	sm

<i>C. polyrhiza</i> morfotipo mendocina Laguna Epulauquen						
Par	S	l	c	r	% de LTCH	n
1	1,42+/-0,21	1,73+/-0,22	3,15+/-0,41	1,21+/-0,11	12,00	m
2	1,30+/-0,21	1,57+/-0,25	2,87+/-0,44	1,21+/-0,13	10,93	m
3	1,16+/-0,19	1,71+/-0,33	2,87+/-0,44	1,48+/-0,29	10,92	m
4	1,10+/-0,17	1,49+/-0,18	2,58+/-0,33	1,36+/-0,1	9,83	m
5	1,19+/-0,18	2,33+/-0,44	3,53+/-0,61	1,95+/-0,15	13,42	sm
6	1,13+/-0,23	2,26+/-0,42	3,39+/-0,63	2,00+/-0,21	12,90	sm
7	1,05+/-0,16	1,91+/-0,26	2,96+/-0,41	1,83+/-0,21	11,25	sm
8	0,91+/-0,21	1,74+/-0,29	2,65+/-0,47	1,92+/-0,29	10,08	sm
9	0,74+/-0,12	1,54+/-0,22	2,27+/-0,33	2,09+/-0,17	8,65	sm

<i>C. polyrhiza</i> morfotipo mendocina Lochiel						
Par	S	l	c	r	% de LTCH	n
1	1,20+/-0,22	1,57+/-0,23	2,77+/-0,38	1,31+/-0,21	12,40	m
2	1,24+/-0,21	1,50+/-0,18	2,75+/-0,37	1,21+/-0,12	12,29	m
3	1,17+/-0,09	1,48+/-0,24	2,66+/-0,28	1,26+/-0,18	11,88	m
4	1,03+/-0,15	1,45+/-0,13	2,47+/-0,22	1,41+/-0,18	11,07	m
5	0,95+/-0,1	1,32+/-0,14	2,28+/-0,18	1,39+/-0,17	10,19	m
6	0,88+/-0,12	1,21+/-0,21	2,09+/-0,28	1,38+/-0,22	9,35	m
7	0,90+/-0,21	1,86+/-0,28	2,77+/-0,44	2,06+/-0,38	12,38	sm
8	0,87+/-0,12	1,65+/-0,22	2,51+/-0,32	1,90+/-0,18	11,24	sm
9	0,70+/-0,12	1,36+/-0,26	2,06+/-0,31	1,93+/-0,37	9,20	sm

<i>C. polyrhiza</i> morfotipo polyrhiza Charles Fuhr						
Par	s	l	c	r	% de LTCH	n
1	1,41+/-0,2	1,83+/-0,19	3,24+/-0,36	1,29+/-0,12	13,04	m
2	1,33+/-0,18	1,74+/-0,2	3,07+/-0,36	1,30+/-0,1	12,34	m
3	1,22+/-0,14	1,59+/-0,17	2,81+/-0,29	1,30+/-0,12	11,30	m
4	1,07+/-0,18	1,57+/-0,17	2,64+/-0,33	1,46+/-0,16	10,64	m
5	1,11+/-0,12	1,49+/-0,2	2,60+/-0,29	1,34+/-0,15	10,46	m
6	1,09+/-0,13	1,47+/-0,3	2,57+/-0,41	1,35+/-0,18	10,33	m
7	1,03+/-0,08	1,87+/-0,22	2,90+/-0,27	1,82+/-0,16	11,68	sm
8	0,98+/-0,1	1,71+/-0,22	2,68+/-0,32	1,75+/-0,08	10,80	sm
9	0,85+/-0,16	1,49+/-0,23	2,34+/-0,36	1,75+/-0,25	9,40	sm

<i>C. polyrhiza</i> morfotipo polyrhiza Esquel						
Par	s	l	c	r	% de LTCH	n
1	1,11+/-0,07	1,41+/-0,08	2,53+/-0,15	1,27+/-0,05	12,12	m
2	1,14+/-0,07	1,31+/-0,07	2,46+/-0,09	1,150,12+/-	11,79	m
3	1,01+/-0,08	1,26+/-0,09	2,26+/-0,13	1,25+/-0,12	10,85	m
4	1,05+/-0,07	1,20+/-0,06	2,25+/-0,1	1,14+/-0,09	10,81	m
5	0,95+/-0,06	1,31+/-0,09	2,25+/-0,11	1,38+/-0,13	10,81	m
6	0,96+/-0,08	1,18+/-0,11	2,14+/-0,16	1,22+/-0,13	10,28	m
7	0,89+/-0,07	1,71+/-0,11	2,60+/-0,12	1,92+/-0,21	12,49	sm
8	0,79+/-0,08	1,53+/-0,11	2,31+/-0,13	1,94+/-0,26	11,09	sm
9	0,74+/-0,06	1,30+/-0,09	2,03+/-0,14	1,77+/-0,09	9,76	sm

<i>C. polyrhiza</i> morfotipo polyrhiza La Bomba						
Par	s	l	c	r	% de LTCH	n
1	1,25+/-0,19	1,71+/-0,3	2,96+/-0,47	1,36+/-0,13	13,17	m
2	1,20+/-0,24	1,49+/-0,23	2,69+/-0,46	1,24+/-0,12	11,96	m
3	1,13+/-0,19	1,38+/-0,19	2,51+/-0,34	1,22+/-0,18	11,15	m
4	1,12+/-0,17	1,34+/-0,17	2,46+/-0,32	1,20+/-0,14	10,91	m
5	0,98+/-0,14	1,32+/-0,17	2,30+/-0,29	1,36+/-0,15	10,22	m

6	0,87+/-0,15	1,42+/-0,26	2,29+/-0,38	1,62+/-0,25	10,16	m
7	0,86+/-0,14	1,92+/-0,25	2,78+/-0,37	2,23+/-0,26	12,33	sm
8	0,79+/-0,15	1,62+/-0,27	2,41+/-0,4	2,06+/-0,24	10,72	sm
9	0,71+/-0,12	1,40+/-0,16	2,11+/-0,24	1,98+/-0,29	9,38	sm

<i>C. polyrhiza</i> morfotipo prichardii Villa Catedral						
Par	s	l	c	r	% de LTCH	n
1	1,40+/-0,38	1,73+/-0,39	3,14+/-0,65	1,24+/-0,26	4,47	m
2	1,26+/-0,21	1,62+/-0,29	3,05+/-0,51	1,29+/-0,2	4,34	m
3	1,25+/-0,34	1,79+/-0,34	2,99+/-0,72	1,43+/-0,17	4,25	m
4	1,25+/-0,12	1,47+/-0,3	2,90+/-0,34	1,18+/-0,1	4,13	m
5	1,28+/-0,32	1,65+/-0,29	2,90+/-0,6	1,30+/-0,15	4,12	m
6	1,26+/-0,21	1,65+/-0,23	2,89+/-0,44	1,31+/-0,2	4,11	m
7	1,15+/-0,36	1,72+/-0,5	2,87+/-0,8	1,49+/-0,12	4,09	m
8	1,25+/-0,12	1,53+/-0,23	2,78+/-0,28	1,22+/-0,03	3,95	m
9	1,25+/-0,24	1,53+/-0,17	2,74+/-0,45	1,22+/-0,09	3,89	m
10	1,23+/-0,31	1,53+/-0,22	2,71+/-0,6	1,24+/-0,15	3,86	m
11	1,20+/-0,13	1,43+/-0,24	2,69+/-0,31	1,20+/-0,2	3,83	m
12	1,18+/-0,13	1,42+/-0,28	2,62+/-0,37	1,20+/-0,1	3,73	m
13	0,90+/-0,03	1,55+/-0,12	2,55+/-0,15	1,72+/-0,18	3,63	m
14	1,13+/-0,13	1,40+/-0,24	2,54+/-0,4	1,24+/-0,14	3,62	m
15	1,15+/-0,12	1,38+/-0,25	2,52+/-0,35	1,20+/-0,14	3,59	m
16	1,12+/-0,07	1,36+/-0,17	2,52+/-0,29	1,21+/-0,18	3,59	m
17	1,11+/-0,14	1,29+/-0,27	2,44+/-0,29	1,16+/-0,15	3,47	m
18	0,86+/-0,1	1,42+/-0,21	2,40+/-0,19	1,66+/-0,2	3,41	m
19	1,02+/-0,11	1,16+/-0,24	2,31+/-0,33	1,13+/-0,23	3,29	m
20	0,91+/-0,18	1,04+/-0,32	2,05+/-0,41	1,14+/-0,09	2,92	m
21	0,87+/-0,18	1,08+/-0,5	1,92+/-0,35	1,25+/-0,55	2,72	m
22	0,92+/-0,18	1,68+/-0,1	2,56+/-0,43	1,84+/-0,21	3,64	sm
23	0,85+/-0,18	1,68+/-0,33	2,33+/-0,3	1,96+/-0,38	3,31	sm

24	0,77+/-0,12	1,49+/-0,21	2,19+/-0,32	1,94+/-0,15	3,12	sm
25	0,83+/-0,25	1,56+/-0,36	1,86+/-0,53	1,88+/-0,55	2,65	sm
26	1,06+/-0,28	1,89+/-0,16	3,00+/-0,6	1,78+/-0,29	4,27	sm
27	0,96+/-0,13	1,68+/-0,26	2,80+/-0,25	1,75+/-0,28	3,99	sm

<i>C. uniflora</i> Lago Burmeister						
Par	s	l	c	r	% de LTCH	n
1	1,28+/-0,12	1,60+/-0,14	2,89+/-0,21	1,25+/-0,12	12,89	m
2	1,19+/-0,09	1,48+/-0,17	2,66+/-0,17	1,25+/-0,19	11,90	m
3	1,13+/-0,21	1,46+/-0,19	2,60+/-0,38	1,29+/-0,13	11,61	m
4	1,02+/-0,08	1,43+/-0,14	2,45+/-0,18	1,39+/-0,16	10,93	m
5	0,96+/-0,14	1,35+/-0,09	2,31+/-0,14	1,41+/-0,28	10,32	m
6	0,96+/-0,13	1,29+/-0,09	2,24+/-0,17	1,35+/-0,18	10,02	m
7	0,95+/-0,08	1,63+/-0,2	2,59+/-0,25	1,71+/-0,16	11,55	sm
8	0,86+/-0,11	1,55+/-0,15	2,41+/-0,24	1,79+/-0,14	10,77	sm
9	0,79+/-0,13	1,46+/-0,16	2,24+/-0,26	1,85+/-0,28	10,02	sm

ANEXO II - Análisis de caracteres cualitativos

a) Tablas de frecuencia relativa y absoluta

Numero cromosómico	Frecuencia relativa	Frecuencia Absoluta
$2n=2x=18$	0,888888889	0,888888889
$2n=6x=54$	0,111111111	1

Fórmula cariotípica (n)	Frecuencia relativa	Frecuencia Absoluta
8m+1sm	0,111111111	0,111111111
6m+3sm	0,555555556	0,666666667
4m+5sm	0,222222222	0,888888889
21m+6sm	0,111111111	1

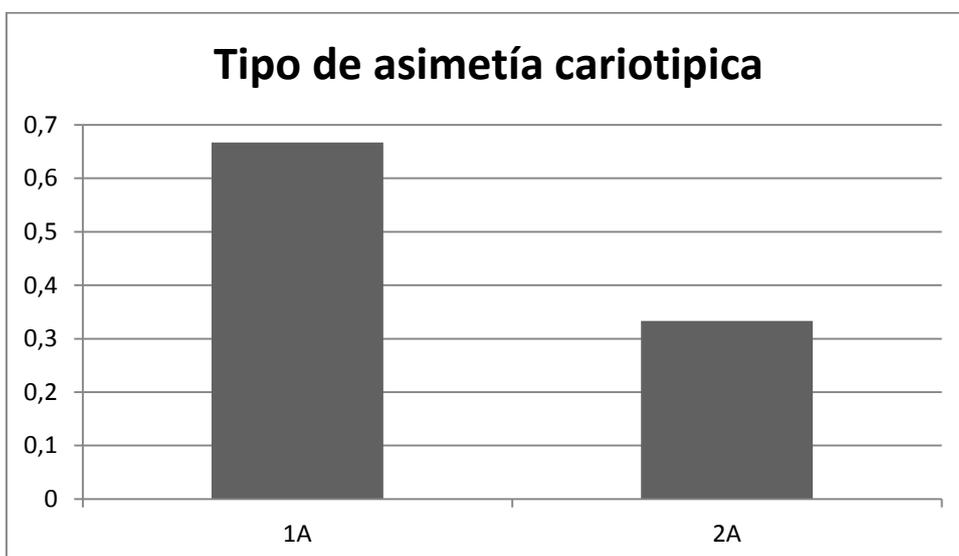
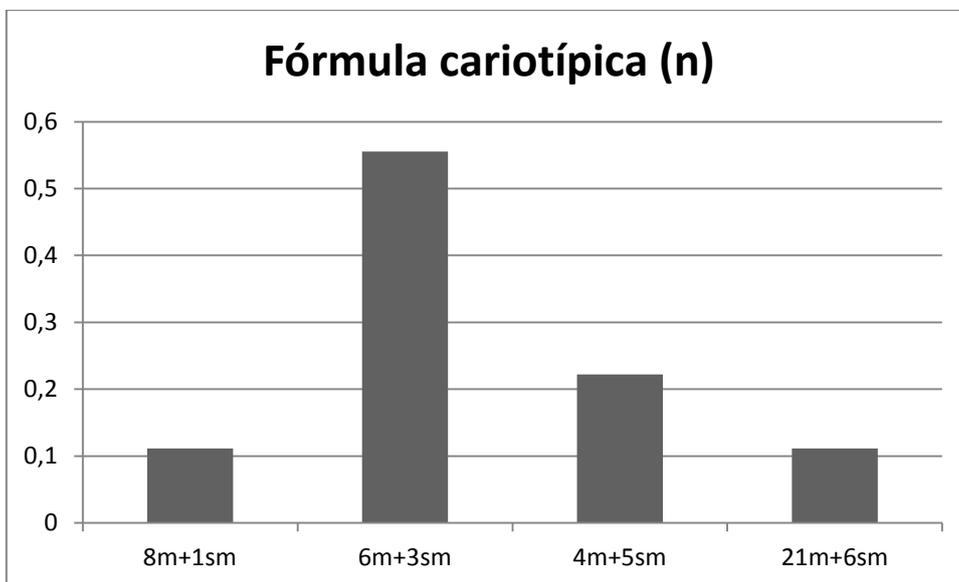
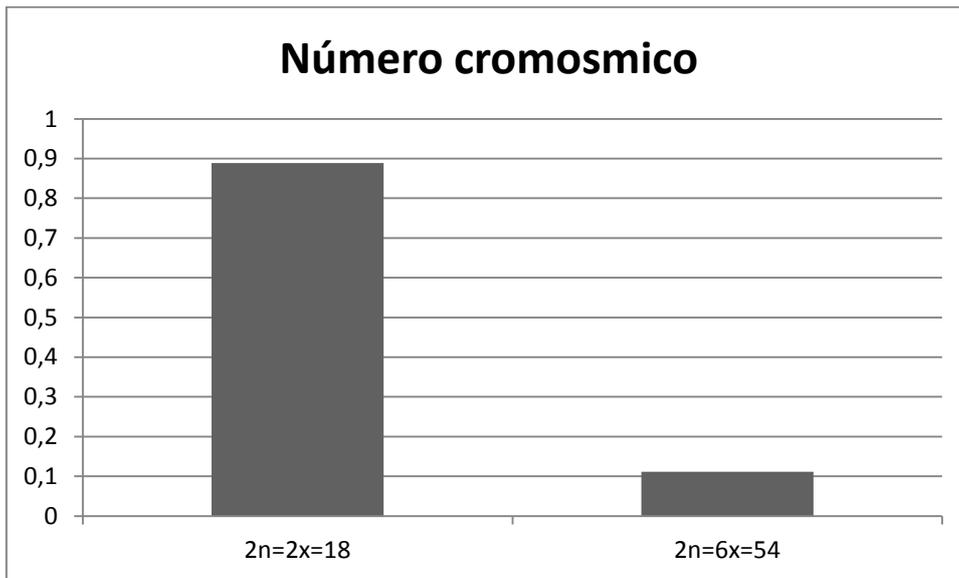
Tipo de asimetría cariotípica **	Frecuencia relativa	Frecuencia Absoluta
1A	0,666666667	0,666666667
2A	0,333333333	1

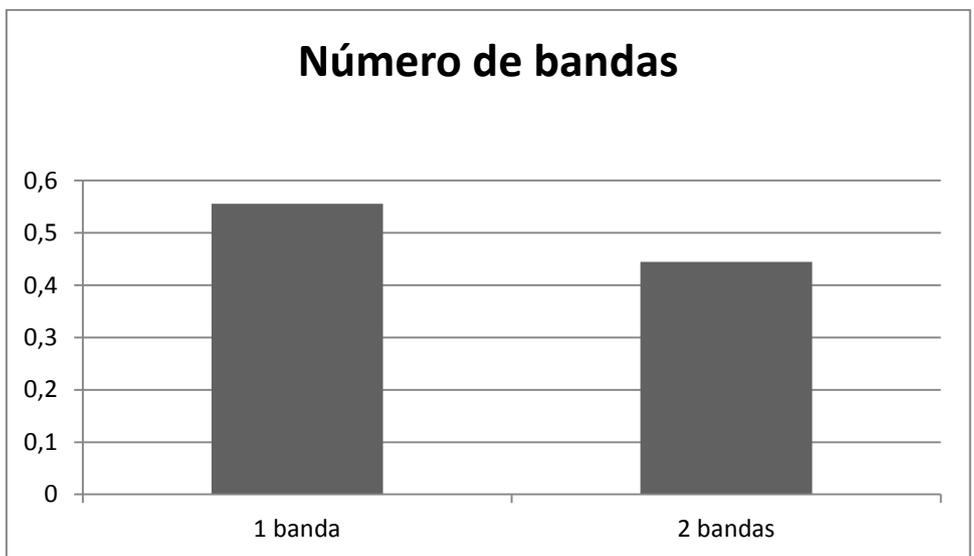
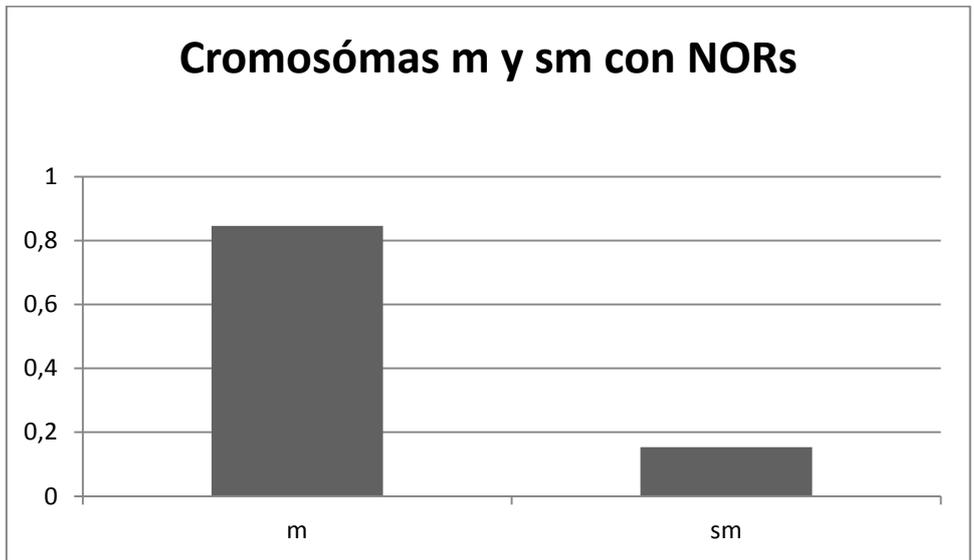
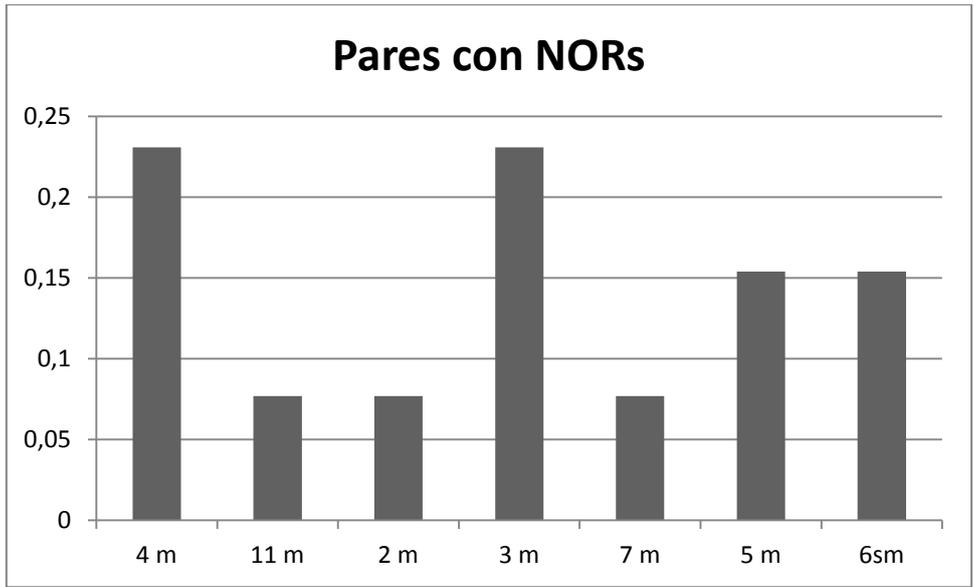
Pares con NOR	Frecuencia relativa	Frecuencia Absoluta
4 m	0,230769231	0,230769231
11 m	0,076923077	0,307692308
2 m	0,076923077	0,384615385
3 m	0,230769231	0,615384615
7 m	0,076923077	0,692307692
5 m	0,153846154	0,846153846
6sm	0,153846154	1

Número de bandas CMA+/DA/DAPI-	Frecuencia relativa	Frecuencia Absoluta
1 banda	0,555555556	0,555555556
2 bandas	0,444444444	1

Pares NORs en m y sm	Frecuencia relativa	Frecuencia Absoluta
m	0,846153846	0,846153846
sm	0,153846154	1

b) Gráficos de frecuencias relativas de caracteres cualitativos





ANEXO III -Análisis ANOVA para caracteres cuantitativos

Análisis estadístico del valor cromosómico promedio (c) entre morfotipos

Nueva tabla : 29/10/2016 - 17:06:14 - [Versión : 17/06/2015]

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
R	9	0,73	0,56	4,58

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,06	3	0,02	4,44	0,0711
Morfotipos	0,06	3	0,02	4,44	0,0711
Error	0,02	5	4,9E-03		
Total	0,09	8			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,26792
 Error: 0,0049 gl: 5

Morfotipos	Medias	n	E.E.
P.Pri	1,36	1	0,07 A
P.L.	1,46	2	0,05 A
P.P	1,52	3	0,04 A
P.M.	1,62	3	0,04 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Homogeneidad de la Varianza de errores

Nueva tabla : 29/10/2016 - 17:08:02 - [Versión : 17/06/2015]

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
RABS R	9	0,37	0,00	64,81

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	2,4E-03	3	8,0E-04	0,97	0,4769
Morfotipos	2,4E-03	3	8,0E-04	0,97	0,4769
Error	4,1E-03	5	8,3E-04		
Total	0,01	8			

Shapiro Wilk

Nueva tabla : 29/10/2016 - 17:32:31 - [Versión : 17/06/2015]

Shapiro-Wilks (modificado)

Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
RDUO R	9	0,00	0,06	0,88	0,2126

Análisis estadístico del índice braquial promedio (r) entre morfotipos

Nueva tabla : 29/10/2016 - 19:21:40 - [Versión : 17/06/2015]

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
R	9	0,73	0,56	4,58

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,06	3	0,02	4,44	0,0711
Morfotipos	0,06	3	0,02	4,44	0,0711
Error	0,02	5	4,9E-03		
Total	0,09	8			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,26792
 Error: 0,0049 gl: 5

Morfotipos	Medias	n	E.E.
P.Pri	1,36	1	0,07 A
P.L.	1,46	2	0,05 A
P.P	1,52	3	0,04 A
P.M.	1,62	3	0,04 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Homogeneidad de varianza

Nueva tabla : 29/10/2016 - 19:23:09 - [Versión : 17/06/2015]

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
RABS R	9	0,37	0,00	64,81

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	2,4E-03	3	8,0E-04	0,97	0,4769
Morfotipos	2,4E-03	3	8,0E-04	0,97	0,4769
Error	4,1E-03	5	8,3E-04		
Total	0,01	8			

Shapiro wilks

Nueva tabla : 29/10/2016 - 19:24:00 - [Versión : 17/06/2015]

Shapiro-Wilks (modificado)

Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
RDUO R	9	0,00	0,06	0,88	0,2126

Análisis estadístico del porcentaje de heterocromatina (%HC) entre morfotipos

P. Pri: prichardii; P.P: polyrhiza; P.M. mendocina; P.L.: lanceolata

Nueva tabla : 29/10/2016 - 19:24:46 - [Versión : 17/06/2015]

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
HC	9	0,81	0,70	21,05

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	7,29	3	2,43	7,17	0,0292
Morfotipos	7,29	3	2,43	7,17	0,0292
Error	1,69	5	0,34		
Total	8,98	8			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=2,23472
 Error: 0,3386 gl: 5

Morfotipos	Medias	n	E.E.
P.Pri	1,02	1	0,58 A
P.P	2,09	3	0,34 A B
P.M.	3,42	3	0,34 B
P.L.	3,66	2	0,41 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Homogeneidad de Varianza

Nueva tabla : 29/10/2016 - 19:27:02 - [Versión : 17/06/2015]

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
RABS HC	9	0,57	0,32	58,38

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,30	3	0,10	2,25	0,1999
Morfotipos	0,30	3	0,10	2,25	0,1999
Error	0,22	5	0,04		
Total	0,52	8			

Shapiro wilks

Nueva tabla : 29/10/2016 - 19:29:06 - [Versión : 17/06/2015]

Shapiro-Wilks (modificado)

Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
RDUO HC	9	0,00	0,46	0,91	0,4412

Análisis estadístico del largo total del complemento haploide (LTCH) entre morfotipos

Nueva tabla : 29/10/2016 - 19:35:51 - [Versión : 17/06/2015]

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
LTCH	9	0,99	0,99	6,56

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	1935,35	3	645,12	182,59	<0,0001
Morfotipo	1935,35	3	645,12	182,59	<0,0001
Error	17,67	5	3,53		
Total	1953,02	8			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=7,21901
 Error: 3,5331 gl: 5

Morfotipo	Medias	n	E.E.	
polyrhiza	22,77	3	1,09	A
lanceolata	23,13	2	1,33	A
mendocina	24,43	3	1,09	A
prichardii	70,09	1	1,88	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Homogeneidad de la Varianza

Nueva tabla : 29/10/2016 - 19:37:37 - [Versión : 17/06/2015]

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
RABS LTCH	9	0,30	0,00	76,46

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	1,67	3	0,56	0,71	0,5859
Morfotipo	1,67	3	0,56	0,71	0,5859
Error	3,92	5	0,78		
Total	5,59	8			

Shapiro wilks

Nueva tabla : 29/10/2016 - 19:39:07 - [Versión : 17/06/2015]

Shapiro-Wilks (modificado)

Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
RDUO LTCH	9	0,00	1,49	0,92	0,5273

Análisis estadístico del Índice de asimetría A1

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
A1	9	0,63	0,41	11,30

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,01	3	3,5E-03	2,84	0,1448
Localidades	0,01	3	3,5E-03	2,84	0,1448
Error	0,01	5	1,2E-03		
Total	0,02	8			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,13451

Error: 0,0012 gl: 5

Localidades	Medias	n	E.E.
P.Pri	0,27	1	0,04 A
P.L.	0,27	2	0,02 A
P.P	0,31	3	0,02 A
P.M.	0,35	3	0,02 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Homogeneidad de la Varianza

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
RABS A1	9	0,75	0,61	40,99

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	1,3E-03	3	4,2E-04	5,12	0,0553
Localidades	1,3E-03	3	4,2E-04	5,12	0,0553
Error	4,1E-04	5	8,3E-05		
Total	1,7E-03	8			

Shapiro wilks

Shapiro-Wilks (modificado)

Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
RDUO A1	9	0,00	0,03	0,91	0,4571

Análisis estadístico del Índice de asimetría A2

A2

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
A2	9	0,20	0,00	29,08

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	1,3E-03	3	4,3E-04	0,42	0,7481
Morfotipo	1,3E-03	3	4,3E-04	0,42	0,7481
Error	0,01	5	1,0E-03		
Total	0,01	8			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,12286
 Error: 0,0010 gl: 5

Morfotipo	Medias	n	E.E.
mend	0,10	3	0,02 A
poly	0,11	3	0,02 A
lanc	0,12	2	0,02 A
prich	0,14	1	0,03 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Homogeneidad de la Varianza

RABS_A2

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
RABS A2	9	0,62	0,40	49,99

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	8,6E-04	3	2,9E-04	2,78	0,1500
Morfotipo	8,6E-04	3	2,9E-04	2,78	0,1500
Error	5,2E-04	5	1,0E-04		
Total	1,4E-03	8			

Shapiro wilks

Shapiro-Wilks (modificado)

Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
RDUO A2	9	0,00	0,03	0,91	0,4462

ANEXO IV - Tabla de datos cuantitativos y cualitativos codificados para análisis fenético

Morfotipo Localidad	2n	Fórmula	Posición de NORs								%HC	LTCH	c	r	R	A1	A2	TAC	Haplotipo					Altitud	Latitud	Región
			4	3	2	6	5	7	11	H1									H7	H21	H24	H16				
polyrhiza CHF	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	3.31	24.85	2.76	1.49	1.38	0.32	0.11	0	0	0	0	0	1	365	-50,317	0
polyrhiza ESQ	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	4.01	20.96	2.32	1.46	1.28	0.27	0.08	0	1	0	0	0	0	961	-42,922	0
polyrhiza LBO	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	2.55	22.51	2.48	1.6	1.4	0.33	0.13	1	1	0	0	0	0	990	-39,731	0
lanceolata TEL	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	3.97	22.07	2.45	1.51	1.32	0.31	0.08	0	1	0	0	0	0	593	-42,449	0
lanceolata PDA	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	3.74	24.18	2.69	1.33	1.41	0.23	0.15	0	1	1	0	0	0	667	-39,987	0
mendocina LOC	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	2.15	22.35	2.73	1.56	1.35	0.33	0.09	1	1	0	0	0	0	348	-44,705	0
mendocina LEP	0	2	0	1	0	1	0	0	0	0	2.44	26.27	2.92	1.69	1.55	0.37	0.13	1	0	0	1	0	0	1517	-37,825	1
mendocina LTR	0	2	0	1	0	1	0	0	0	0	1.69	24.67	2.74	1.62	1.41	0.36	0.08	0	0	0	0	1	0	1555	-36,838	1
prichardii VCA	1	3	0	0	0	0	0	0	1	0	1.02	70.09	2.59	1.36	1.69	0.27	0.14	0	1	0	0	0	0	1039	-41,173	1
Outgroup LBU	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1.93	22.39	2.49	1.49	1.29	0.31	0.08	0	0	0	0	0	0	914	-47,950	0

Codificación de la Tabla: 2n= 18 (0), 2n=54 (1); Formula: 6m+3sm (0), 8m+1sm (1), 4m+5sm (2), 21m+6sm (3); Tipo de asimetría cariotípica (TAC): A1 (0), A2 (1), Región: estepa (0), Bosque Andino patagónico (1). En el resto de los casos se codificó como ausencia (0) presencia (1). Las referencias se encuentran en la Tabla 1 y 2

ANEXO V - Análisis de mapeo de caracteres cromosómicos



ANEXO VI – Fotos de poblaciones no incluidas en resultados

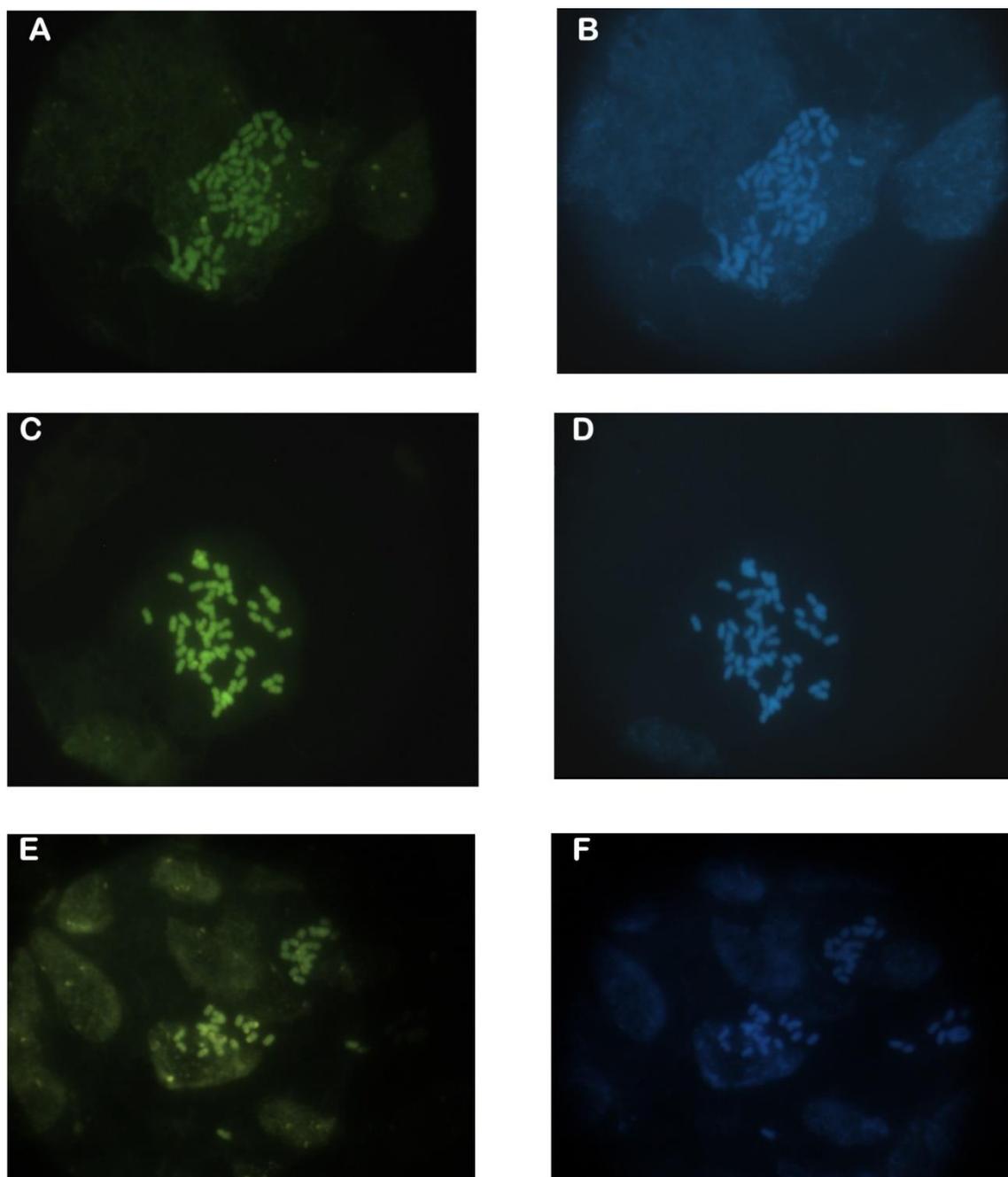


Fig.9. Metafasas mitóticas de *C. polyrhiza* morfotipo *prichardii* (A-D) y *mendocina* (E y F) teñidas secuencialmente con CMA/DA/DAPI. A y B Leleque (Provincia del Chubut); C y D El Bolsón (Cerro Piltriquitron Provincia de Rio Negro); E y F Valle Hermoso (Mendoza)