

Tesis de Licenciatura

Variabilidad isoenzimática en Larrea ameghinoi y Larrea nitida (Zygophyllaceae)

Lia, Verónica

Tesis presentada para obtener el grado de Licenciado en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

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

This document is part of the Six-Year Bachelor's Theses Collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Lia, Verónica. () Variabilidad isoenzimática en Larrea ameghinoi y Larrea nitida (Zygophyllaceae). Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://hdl.handle.net/20.500.12110/seminario_nBIO000679_Lia

Cita tipo Chicago:

Lia, Verónica. "Variabilidad isoenzimática en Larrea ameghinoi y Larrea nitida (Zygophyllaceae)". Tesis de Licenciado. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://hdl.handle.net/20.500.12110/seminario_nBIO000679_Lia

EXACTAS
UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLOGICAS

VARIABILIDAD ISOENZIMATICA EN LARREA AMEGHINOI
Y LARREA NITIDA (ZYGOPHYLLACEAE)

VERONICA LIA

1067 24
LIBRERIA
DRA. CECILIA COMAS - DIRECTORA
LABORATORIO DE GENETICA
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLOGICAS
FCEyN UBA

TESIS DE LICENCIATURA
DICIEMBRE 1998

Agradecimientos

En primer lugar, agradezco a la Dra. Cecilia Comas por permitirme iniciarme en la investigación, por transmitirme sus conocimientos sobre electroforesis y por muchas, muchísimas otras cosas que no es posible enumerar, ni expresar con palabras.

Quiero agradecer, además, al Dr. J. H. Hunziker por proporcionarme el material de trabajo, por invitarme a participar de la colección, por el tiempo dedicado y por sus valiosos consejos y enseñanzas.

Agradezco a la Dra. Viviana Confalonieri y a la Dra. Lidia Poggio por sus sugerencias, por su apoyo y por el estímulo que significaron para mí.

Agradezco especialmente a la Lic. Cecilia Bessega por su invaluable ayuda y por su constante compañía.

Agradezco al Dr. Juan Vilardi por su asesoramiento. Quiero agradecer también, a los nuevos amigos que conocí durante la realización de este trabajo, particularmente a Marina y a Amalia, por todos los momentos compartidos.

Por último, quiero expresar mi más profundo agradecimiento a la **Fundación Antorchas** sin cuyo apoyo no me hubiera sido posible llevar a cabo el presente trabajo.

RESUMEN

El género *Larrea* (Cav.) constituye un caso de distribución disyunta anfitropical, cubriendo extensas regiones áridas y semiáridas de Argentina, Chile, Bolivia, Perú, México y sudoeste de Estados Unidos. Comprende cuatro especies sudamericanas: *L. nitida*, *L. ameghinoi* (Sección Larrea), *L. divaricata*, *L. cuneifolia* y la especie norteamericana *L. tridentata* (Sección Bifolium).

Las cinco especies del género presentan fecundación cruzada. La morfología y menor tamaño floral en *L. nitida* y *L. ameghinoi* ha sugerido que éstas son más proclives a la autofecundación.

Se ha señalado la existencia de hibridación natural entre las cuatro especies sudamericanas. El alto grado de afinidad entre *L. nitida* y *L. ameghinoi*, observado a partir de diversos estudios multidisciplinarios, ha llevado a postular que ambos taxones podrían ser considerados como semiespecies parcialmente simpátricas y constituyentes de un singameón.

Con el objeto de aportar nuevos elementos de juicio para la evaluación de esta hipótesis y a fin de completar la caracterización isoenzimática del género se estudió la variabilidad, diferenciación y grado de divergencia genética en poblaciones naturales de *L. nitida* y *L. ameghinoi*.

El análisis de 11 sistemas isoenzimáticos reveló la existencia de 31 probables *loci*. Trece de ellos fueron monomórficos y presentaron la misma variante alélica tanto *L. ameghinoi* como en *L. nitida*. Se detectaron tres *loci* diagnósticos (Adh-I, Gdh-I, Mdh-I) en donde se observó la fijación de variantes electroforéticas diferentes para cada especie.

El menor grado de diversidad genética, los valores positivos y altamente significativos de los coeficientes de endogamia y la mayor diferenciación entre poblaciones coespecíficas dentro de la sección Larrea en comparación con la sección Bifolium, concuerdan con los mayores porcentajes de autofecundación sugeridos por la morfología floral.

Los valores de Identidad hallados entre poblaciones de *L. ameghinoi* y de *L. nitida* ($I=0.634-0.806$), así como el alto grado de diferenciación entre ambas especies, coincide con lo esperado para poblaciones pertenecientes a **especies cogenéricas distintas**.

INTRODUCCIÓN	1
El género <i>Larrea</i>	2
Electroforesis de isoenzimas	8
OBJETIVOS	13
MATERIALES Y MÉTODOS	14
I. Poblaciones y Especies	14
a.Colección y Conservación del material	14
b.Condiciones de la germinación	15
II. Electroforesis de isoenzimas	15
a. Preparación de los geles	16
b. Preparación de las muestras	16
c. Condiciones de la electroforesis	16
d. Revelado y Fijación de geles	17
e. Número de clasificación de isoenzimas	18
f. Sistemas isoenzimáticos: características y condiciones experimentales	18
g. Soluciones buffer	24
III.Determinación de los probables <i>loci</i> y alelos	25
IV.Análisis estadístico	26
a. Equilibrio de Hardy – Weinberg	27
b. Variabilidad genética	27
c. Estructura poblacional	28
d. Diferenciación genética	29
e. Análisis de agrupamiento	29
RESULTADOS	30
I.Descripción de los patrones electroforéticos	30
II.Análisis estadístico	55
a. Ajuste a las proporciones de Hardy-Weinberg	55
b. Variabilidad genética	59

c. Estructura poblacional	61
d. Diferenciación genética	64
e. Análisis de agrupamiento	65
DISCUSIÓN	67
CONCLUSIONES	76
BIBLIOGRAFÍA	77
Apéndice de abreviaturas	

INTRODUCCION



EL GÉNERO *LARREA*

El género *Larrea* (Cav.) constituye un interesante caso de distribución anfitropical disyunta. Sus representantes cubren extensas regiones áridas y semiáridas de Argentina, Chile, Bolivia, Perú, México y sudoeste de Estados Unidos. Esta característica confiere al género gran importancia biogeográfica (Fig. 1a).

El género pertenece a la familia de las Zygophyllaceae, subfamilia Zygophylloideae, y está compuesto por cinco especies, de las cuales cuatro son sudamericanas (*L. ameghinoi* Speg., *L. nitida* Cav, *L. divaricata* Cav., y *L. cuneifolia* Cav.) y una única especie es norteamericana (*L. tridentata* (DC.) Cov.).

El grupo se encuentra dividido en dos secciones (Fig. 1b) (Palacios y Hunziker, 1972):

Sección Larrea

Hojas multifolioladas. Flores pequeñas.

L. ameghinoi (x=13, 2n=26)

L. nitida (x=13; 2n = 26)

Sección Bifolium

Hojas bifolioladas. Flores grandes.

L. divaricata (x = 13; 2n = 26)

L. cuneifolia (x = 13; 2n = 52)

L. tridentata (x = 13; 2n = 26, 52, 78)

La especie arbustiva *L. nitida* se desarrolla en el oeste y sur de Argentina (Salta a Chubut) y de Chile (Coquimbo, Aconcagua y Santiago), mientras que *L. ameghinoi* es una caméfita leñosa cuya área de distribución se restringe a la Patagonia Argentina (desde Neuquén hasta Santa Cruz).

Larrea divaricata es el arbusto dominante en la región semidesértica central denominada Monte en Argentina, hallándose presente, asimismo, en algunas zonas de Chile (Atacama, Aconcagua) y regiones aisladas de Bolivia (Tarija) y Perú (Chuquibamba, Aplao). El taxón vicario, *L. tridentata*, arbusto dominante en los desiertos comparables de América del Norte, consta de tres razas que corresponden a diferentes grados de ploidía: diploide (2n=26 - Desierto de Chihuahua), tetraploide (2n=52 - Desierto de Sonora) y hexaploide (2n=78 - Desierto de Mohave) (Yang, 1967, 1968, 1970, Yang y Lowe, 1968, Barbour, 1969). Ambas especies han desarrollado agresivos mecanismos de proliferación y dominio territorial, formando extensas y "exclusivas" comunidades (Campos Lopez *et al*, 1979).

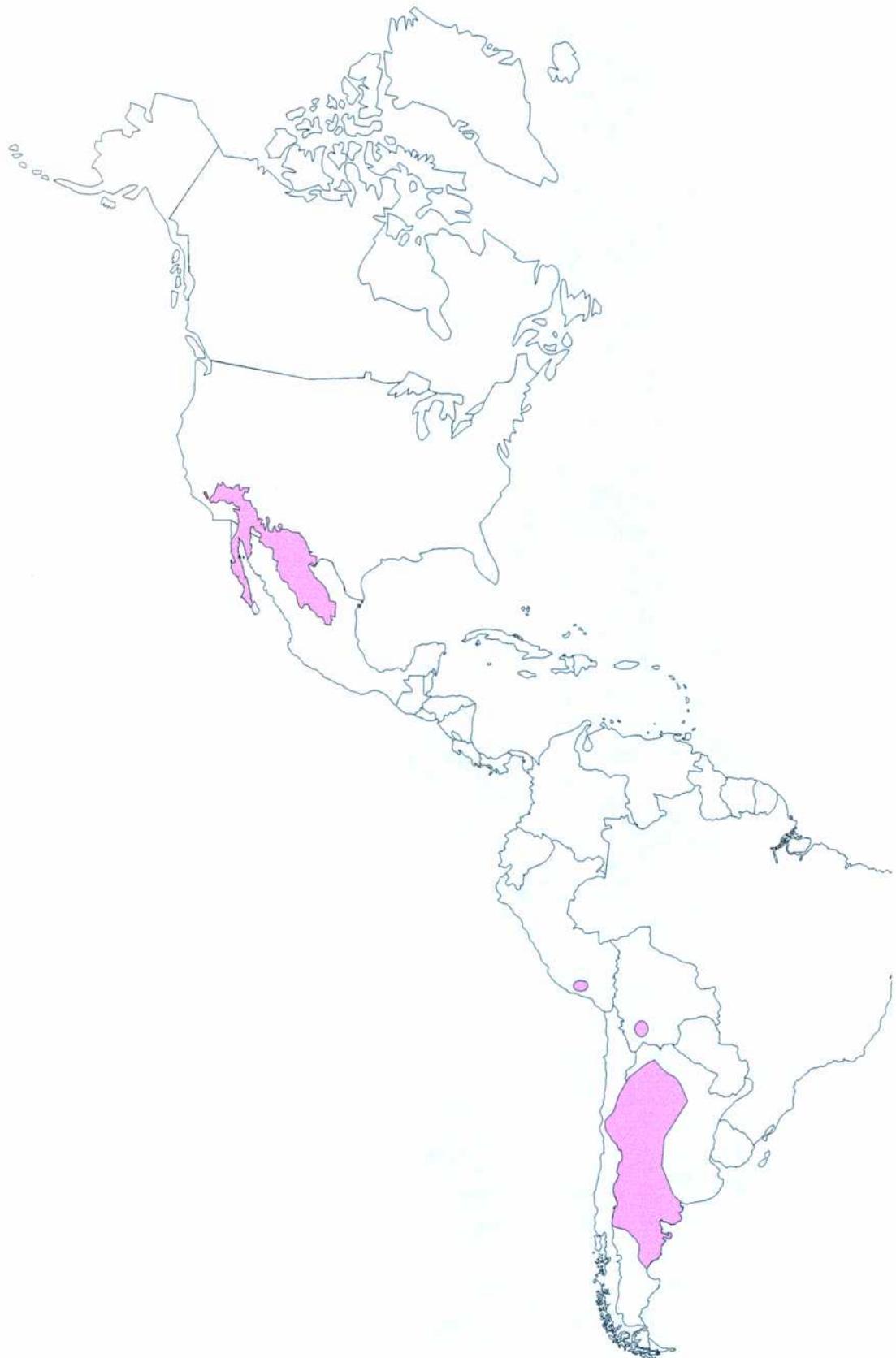
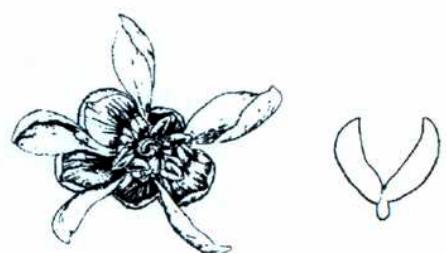


Figura 1a. Distribución disyunta del género *Larrea*

SECCION BIFOLIUM

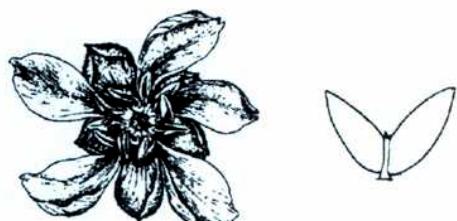
L. tridentata



L. cuneifolia



L. divaricata



SECCION LARREA

L. nitida



L. ameghinoi



Figura 1b. Secciones y especies del género *Larrea*

Dibujos tomados de Simpson et al (1977) y Hunziker et al (1977)

El tetraploide *L. cuneifolia*, también arbustivo, se encuentra ampliamente distribuido, principalmente en la parte Oeste de la Argentina (desde Salta a Chubut).

Las especies de la sección Larrea son más mesofíticas y microtérmicas que las xerófitas extremas de la sección Bifolium. El hábito postrado y la reducción en el número de folíolos característicos de *Larrea ameghinoi* podrían ser interpretados como una adaptación al clima frío y ventoso de la Patagonia. La reducción del área foliar en las especies bifolioladas, junto con otras características morfológicas y fisiológicas, se habrían desarrollado en respuesta a las presiones de selección en los ambientes de mayor aridez. (Hunziker *et al.*, 1977). En *L. cuneifolia*, la hoja se halla reducida a una simple lámina emarginada como consecuencia de la extrema fusión de sus folíolos. Por otro lado, esta especie ha adquirido la extraordinaria capacidad de ubicar sus hojas orientando los epífilos hacia el este, de modo tal que los rayos solares inciden en forma tangencial sobre su superficie (Hunziker *et al.*, 1972). Esta habilidad permite a *L. cuneifolia* colonizar ambientes extremadamente secos, razón por la cual probablemente se trate del taxón xerofíticamente más especializado del género.

Las diferentes razas de *L. tridentata* crecen alopátricamente distribuyéndose a largo de un gradiente creciente de aridez que coincide con un incremento en el grado de ploidía.

Las cinco especies del grupo presentan fecundación cruzada, no obstante, se han registrado diferencias en cuanto a la cantidad relativa de autocompatibilidad y/o autofecundación facultativa. Las características morfológicas y menor tamaño de las flores en las dos especies multifolioladas, conjuntamente con su floración más temprana, indicarían que *L. nitida* y *L. ameghinoi* presentan mayor porcentaje de autofecundación que las especies de la Sección Bifolium (Simpson *et al.*, 1977).

Se ha señalado la existencia de hibridación natural entre las cuatro especies sudamericanas, habiéndose encontrado representantes de cinco de las seis posibles combinaciones interespecíficas (*L. ameghinoi* x *L. nitida*; *L. ameghinoi* x *L. cuneifolia*; *L. cuneifolia* x *L. divaricata*; *L. ameghinoi* x *L. divaricata*; *L. cuneifolia* x *L. nitida*)

En particular, la hibridación entre las especies del par multifoliolado es un fenómeno frecuente en la Patagonia Argentina. La abundancia de individuos con características morfológicas intermedias entre *L. nitida* y *L. ameghinoi* conviviendo en simpatría con éstas últimas en los alrededores del Cerro Lotena, Pcia. de Neuquén, llevó a Sandwith (1927) a describir la especie *L. simulans* en referencia a los mismos. En una revisión posterior del

género Monticelli (1939) señala “*Larrea simulans* se parece mucho a los ejemplares pobres de *L. nitida* y a los ejemplares mejores de *L. ameghinoi*...Los demás caracteres son un poco generales y no llegan a convencer”. En el año 1940, Descole, O'Donnell y Lourteig la consideraron sinónima de *L. nitida* Cav, lo cual fue objetado por Ruiz Leal (1970) quien propuso la rehabilitación de *L. simulans*.

Dado que se ha verificado que el aislamiento reproductivo entre las especies *L. ameghinoi* y *L. nitida* no es completo, es probable que los individuos descriptos como *L. simulans* no sean más que híbridos o introgresantes.

El análisis citogenético de los híbridos *L. ameghinoi* x *L. nitida* ha revelado formación regular de bivalentes en Metafase I, mientras que el porcentaje de mericarpios con semillas es similar al de las especies parentales (Hunziker et al, 1972, 1973, Hunziker et al, 1977, Yang et al, 1977). Del mismo modo, los híbridos entre *L. divaricata* y *L. tridentata* (citotipo diploide) obtenidos artificialmente presentan meiosis regular (Hunziker et al, 1977, Yang et al, 1977), a pesar de lo cual son semiestériles con respecto a la fertilidad de polen y semilla.

La evidencia citogenética del híbrido interespecífico *L. divaricata* x *L. cuneifolia* indicaría que ambos taxones poseen un genoma en común (Hunziker et al, 1972, 1973). Estas observaciones concuerdan con la estrecha relación previamente señalada por Cozzo (1948) sobre la base de la anatomía leñosa.

El estudio de los híbridos intersección ha mostrado irregularidades en la meiosis, así como variabilidad en el número de cromosomas y en sus asociaciones, ocasionadas por la presencia de citomixis.

Una depresión ubicada a 60 km de la localidad de San Antonio Oeste (Ruta 3, km 1194), Provincia de Río Negro, ofrece una excelente oportunidad para el estudio de los procesos de hibridación y especiación ya que en ella coexisten las cinco combinaciones di-híbridas junto con las especies parentales. *L. ameghinoi* es el taxón dominante en la zona más profunda de la depresión cuya extensión alcanza los 400x300 metros con una pendiente de 1/100 metros. Los enjambres híbridos correspondientes a *L. ameghinoi* x *L. cuneifolia* y un ejemplar *L. ameghinoi* x *L. divaricata* de inusuales dimensiones ocupan los estratos intermedios conformando un "cinturón híbrido" que circunda el fondo de la depresión, mientras que en el área perimetral más elevada prevalecen las especies arbustivas (Fig.2).

Los porcentajes de arcilla, limo, N, C, P, Ca, Na y K en la composición del suelo son superiores en la parte más profunda de la depresión, y las estrechas zonas intermedias en donde se encuentran los híbridos presentan características edáficas igualmente intermedias (Hunziker et al, 1977).

Figura 2. Depresión 60 Km al Sur de San Antonio Oeste (Pcia. de Río Negro).
1er. plano: *L. ameghinoi*. 2do. plano: cinturón híbrido. 3er plano: especies arbustivas



Los mecanismos de aislamiento que impedirían, o bien, reducirían el intercambio génico entre las especies sudamericanas, discutidos por Hunziker *et al* 1976, estarían dados por el desfasaje entre las épocas de floración y por sus preferencias ecológicas discordantes.

Los estudios de electroforesis de proteínas seminales (Hunziker *et al*, 1972, 1973, 1977) y de cromatografía de compuestos fenólicos (Hunziker *et al*, 1972, 1973, Mabry *et al*, 1977) han mostrado que cada una de las cuatro especies sudamericanas presenta un patrón característico, en contraposición con las escasas diferencias halladas entre las especies diploides *L. divaricata* y *L. tridentata*.

Los coeficientes de similitud (*I*) obtenidos a partir del análisis de marcadores isoenzimáticos entre poblaciones de *L. tridentata* y *L. divaricata* (Cortés y Hunziker, 1997) han sido similares a los esperados para poblaciones coespecíficas (Thorpe, 1982). La ausencia de heterocigosis fija y de patrones aditivos en las poblaciones tetraploidies de *L. tridentata* indicarían un reducido grado de divergencia entre éstos y sus progenitores diploides (Cortes y Hunziker, 1997).

La afinidad entre las especies dentro de cada sección ha sido inferida sobre la base de los estudios proteicos y citogenéticos.

En relación a la Sección Larrea, se ha propuesto que *L. ameghinoi* y *L. nitida* podrían ser consideradas como semiespecies parcialmente simpátricas (Hunziker, 1977) y constituyentes de un singameón (Grant, 1971).

Dentro de la sección Bifolium, la estrecha relación observada entre *L. cuneifolia* y *L. divaricata* sugiere que éste última (u otra especie muy próxima a ella) habría sido uno de los progenitores del tetraploide. La relación existente entre la norteamericana *L. tridentata* y la sudamericana *L. divaricata* ha sido motivo de controversia. De acuerdo con los resultados de Yang *et al* (1977) obtenidos a partir del análisis de los híbridos, estos taxones corresponderían a una categoría intermedia entre especie y subespecie, tratándose de "semiespecies alopátricas". A la luz de los datos morfológicos, cromatográficos y proteicos Hunziker *et al* (1972) han concluido que las poblaciones tetraploidies y hexaploidies de *L. tridentata* se habrían originado por autopoliploidía interracial.

El origen geográfico del género Larrea ha estado sujeto a discusión y se han formulado diversas hipótesis al respecto. Johnston (1940) ya había propuesto un probable origen sudamericano para el género. Esta teoría fue luego apoyada por los estudios realizados por Hunziker *et al.* (1972, 1973), Hunziker (1975), Hunziker *et al* (1977), y Wells y Hunziker (1977). Axelrod (1950) ha señalado que la actual existencia de tipos australes, tales como *Larrea* en América del Norte, puede ser explicada por migración transtropical hacia fines del Cenozoico. La dispersión a larga distancia puede haber ocurrido a través de una serie de hábitats semiáridos intermedios apropiados que sirvieron como "estaciones" (Raven, 1963).

Wells y colaboradores consideran que, contrariamente a lo postulado por Turner (1972) y Porter (1974), la presente distribución del género en América del Norte sería de muy reciente origen (Wells y Berger, 1967, Wells, 1969, Wells y Hunziker, 1977). De acuerdo con estos autores y con distintas líneas de evidencia, se ha propuesto que *L. tridentata* se habría originado a partir de poblaciones de *L. divaricata* trasportadas a larga distancia por aves migratorias (Hunziker *et al*, 1977, Wells y Hunziker, 1977).

Entre los posibles agentes de dispersión en este transporte desde Sud a Norteamérica se ha citado, entre otros, el "chorlo dorado" (*Pluvialis dominica*), conocido por sus vuelos a larga distancia sin interrupciones durante su migración anual intercontinental (Hunziker *et al*, 1977, Wells y Hunziker, 1977).

Los registros paleobotánicos resultan insuficientes para determinar con exactitud el período durante el cual se produjo el establecimiento y colonización de *Larrea* en América del

Norte, pudiendo haber arribado al sur de México antes o después de la transición del Pleistoceno al Holoceno. Sin embargo, existen sólidas evidencias que sostienen que la amplia dominancia de *Larrea* en América del Norte no tuvo lugar sino hasta el Holoceno (Wells y Hunziker, 1977).

ELECTROFORESIS DE ISOENZIMAS

Fundamentos de la técnica

La electroforesis se basa en la migración diferencial de las proteínas en un campo eléctrico. La velocidad de desplazamiento de las partículas depende de la carga eléctrica neta de su superficie externa y de su tamaño y forma.

El concepto de **isoenzima** fue introducido por Markert & Müller (1959) quienes las definieron como "diferentes formas moleculares de una proteína con la misma especificidad enzimática". Prakash et al (1969) establecieron el término **aloenzima** en referencia a "las variantes proteicas producidas por diferentes formas alélicas del mismo locus."

El método fue inicialmente desarrollado por Tiselius (1937), sucediéndole numerosos investigadores cuyos aportes contribuyeron a mejorarlo (Smithies y Poulik, 1956, Raymond y Weintraub, 1959, Ornstein y Davis, 1959). La base para detectar específicamente alguna enzima fue ideada en el año 1939 por Gomori (Gomori, 1939) quien utilizó métodos histoquímicos para identificar sitios de fosfatasa alcalina en tejidos animales. En el año 1956, Hunter y Markert aplicaron los métodos de tinción específica a geles de almidón para visualizar las áreas que presentaban actividad esterasa, como resultado obtuvieron bandas (o zonas) que aparecían directamente sobre el medio soporte. La posición de las enzimas sobre los geles luego de la electroforesis fue denominada **zimograma**.

La separación electroforética de complejas mezclas proteicas puede ser llevada a cabo en diversos medios soporte, tales como almidón, poliacrilamida y agarosa. La utilización de poliacrilamida ofrece un alto grado de resolución y flexibilidad en el espectro de pesos moleculares o dimensiones separables (Blackshear, 1984, Leaback, 1976) debido a la posibilidad de regular el tamaño de los poros mediante la alteración del porcentaje de acrilamida. Su unifomidad y transparencia facilitan la visualización de resultados, la inercia de sus componentes permite amplia compatibilidad de ensayos, y el tiempo

consumido por la corrida es menor que en el caso del almidón. (Chrambach y Rodbard, 1971, Hames y Rickwood, 1981).

La obtención de extractos proteicos puede realizarse a partir de una extensa variedad de tejidos, la elección de los mismos dependerá del material en estudio. En el caso de las plantas, las semillas remojadas, plántulas, u hojas jóvenes son los más utilizados ya que presentan mayor actividad enzimática. Las condiciones ontológicas y fisiológicas de las muestras deben ser cuidadosamente ajustadas a fin de evitar diferencias de regulación que podrían conducir a interpretaciones erróneas.

En relación a los buffers, tanto para la preparación de geles como para los electrodos, muchos han sido los manuales publicados durante la pasada década (Cardy *et al*, 1983, O'Malley *et al*, 1980, Conkle *et al*, 1982, Soltis *et al*, 1983, Morden *et al*, 1987). La experiencia acumulada a través de años de investigación ha permitido determinar cuáles son los buffers de utilidad en la resolución de un espectro adecuado de sistemas. No obstante, al igual que con los buffers de extracción, las condiciones óptimas para cada grupo deben ser halladas empíricamente.

Una vez finalizada la electroforesis, las isoenzimas se detectan *in situ* a través de su actividad específica. Los principios generales concernientes a la tinción de la actividad enzimática así como a la química de la localización enzimática en geles han sido recopilados por Gabriel (1971), Ostrowski (1983), y Vallejos (1983). Luego de sumergir el gel en la solución de tinción apropiada, los sustratos y demás reactivos necesarios difunden a través del gel, reaccionando únicamente con la enzima deseada. La detección se basa en la precipitación de colorantes solubles que funcionan como indicadores al tornarse insolubles, revelando de este modo las zonas de actividad.

El nombre sistemático de una isoenzima es asignado de acuerdo con las recomendaciones del comité de nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímicos (I.U.B, 1984), asimismo, cada una de ellas recibe un número de comisión enzimática E.C.

El patrón de bandas resultante para cada individuo es el fenotipo electroforético. La complejidad de estos últimos es extremadamente variable y depende del sistema isoenzimático analizado, de los tejidos en consideración, y del organismo en estudio. En algunos casos pueden consistir en una única banda invariable cuya interpretación es indudablemente sencilla. Sin embargo, algunas enzimas pueden estar codificadas por más de un gen y presentar fenotipos más complejos.

A pesar de que los datos de velocidad de migración y número de bandas pueden resultar informativos en algunos estudios, la mayoría de las veces los análisis exigen una interpretación genotípica que permita la identificación de los *loci* subyacentes. La correcta interpretación de los patrones requiere un profundo conocimiento del marco de trabajo. El

número de genes codificados, sus estados alélicos, y su localización celular son factores cuya definición reviste crucial importancia (Gottlieb, 1977).

Para lograr una muestra aleatoria y representativa del genoma deben elegirse sistemas isoenzimáticos que cubran todo el espectro metabólico, desde las enzimas involucradas en el metabolismo energético, usualmente menos variables, hasta las enzimas no específicas del metabolismo periférico, en donde la ocurrencia de polimorfismos es un fenómeno frecuente.

Utilización en estudios poblacionales, sistemáticos y evolutivos

La técnica de electroforesis de enzimas fue introducida en los estudios poblacionales cuando Lewontin y Hubby (1966) y Harris (1977) intentaron medir la variabilidad genética en poblaciones naturales. Desde entonces, cada vez más genetistas de poblaciones y evolucionistas se han interesado por el significado biológico de la variación polimórfica en la estructura primaria de las proteínas (Le Cam *et al*, 1972, Lewontin, 1979, Nei, 1975).

Las aloenzimas exhiben herencia mendeliana y funcionan como marcadores codominantes, lo cual permite calcular las frecuencias alélicas tanto a nivel poblacional como específico. A partir de estos datos las similitudes y diferencias entre poblaciones pueden ser cuantificadas mediante parámetros estadísticos adecuados (Gottlieb 1977, 1981). Por otro lado, la técnica brinda la posibilidad de establecer con precisión el número de loci analizados.

Un aspecto fundamental consiste en la determinación del tamaño de la muestra a estudiar. Dado el alto grado de polimorfismo existente en poblaciones animales y vegetales (Shannon, 1968, Selander *et al*, 1971, Gottlieb, 1977, Hamrick, 1979), un estudio isoenzimático destinado a analizar las variaciones interespecíficas requeriría un muestreo que permitiera estimar toda la variabilidad existente dentro de cada especie. En general, se ha mostrado que las similitudes genéticas entre poblaciones coespecíficas son extremadamente altas. Este hecho sugiere que, en la mayoría de los casos, las evidencias electroforéticas de unas pocas poblaciones constituyen una muestra adecuada de la especie en estudio (Gottlieb, 1977). En este sentido, es necesario tener en cuenta el tipo de fecundación de la especie en cuestión (Gottlieb, 1981).

El número de individuos a analizar en cada población dependerá de cuán importante sea detectar alelos en baja frecuencia. Según lo sugieren Marshall y Brown (1975), en la mayoría de los casos basta con 30 individuos diploides para proveer un 95 por ciento de probabilidades de detectar los veinte alelos de un locus polimórfico cada uno de ellos con una frecuencia de 0.05.

La exactitud de los coeficientes de distancia como estimaciones de la diferenciación genética ha estado sujeta a ciertos cuestionamientos. Una forma de incrementar la confiabilidad de estos estimadores es aumentar el número de individuos incluidos en la muestra., el número de *loci* computados, o ambos. Sin embargo, se ha demostrado que el número de *loci* es el componente de mayor efecto mayor sobre los mismos (Gorman y Renzi, 1979, Miyamoto, 1983). Otras consideraciones incluyen la elección de los coeficientes más apropiados y de los algoritmos de agrupamiento.

Los coeficientes de Nei (Nei, 1972) y Rogers (Rogers, 1972) son los más citados en la literatura científica. El coeficiente de distancia de Nei posee un significado biológico asociado ya que puede ser interpretado como el número medio de sustituciones por locus (electroforéticamente detectables) que se han acumulado desde la divergencia de dos poblaciones a partir de un ancestro común. Este coeficiente permite la corrección del error introducido por muestras pequeñas (Nei, 1978), pero no satisface la desigualdad triangular. El coeficiente de Roger no tiene interpretación biológica, estima la distancia geométrica media entre las frecuencias alélicas considerando todos los loci, y, a diferencia del anterior, cumple con la desigualdad, razón por la cual tiene menos restricciones teóricas en su uso para algunos algoritmos de agrupamiento.

Nei *et al* (1983) compararon cinco estimadores de distancia (incluyendo Nei y Roger) y tres métodos de agrupamiento (UPGMA-Distancia de Wagner-Método de Farris modificado) mediante la simulación de filogenias. Las conclusiones señalan al coeficiente de Nei como la mejor elección para la estimación de distancias, mientras que el algoritmo de preferencia para el agrupamiento es el UPGMA.

La electroforesis de isoenzimas ha aportado datos de fundamental importancia para la comprensión de interrogantes evolutivos y sistemáticos.

En grupos taxonómicamente difíciles, los estudios isoenzimáticos pueden resultar de particular utilidad en la definición de las especies, especialmente, en plantas con alta plasticidad fenotípica y de difícil clasificación sobre la base de diferencias morfológicas.

El análisis de los datos obtenidos a partir de esta técnica ha permitido elaborar hipótesis relacionadas con modos de especiación y tiempo de divergencia, así como determinar la relación entre distintas especies cogenéricas. Del mismo modo, provee elementos confiables para probar especiación híbrida a nivel diploide, en el caso de que las probables especies progenitoras hayan divergido lo suficiente en sus *loci* isoenzimáticos. Por presentar herencia mendeliana simple, las aloenzimas permiten detectar la presencia de variantes alélicas características de los progenitores propuestos en las plantas híbridas.

A nivel de poliploides, las evidencias genéticas obtenidas contribuyen a dilucidar el origen alo o autopoliploide de las especies en estudio. En tetraploides, la herencia disómica y heterocigosis fija son características de alopoliploides mientras que la herencia tetrasómica es un rasgo propio de los autopoliploides.

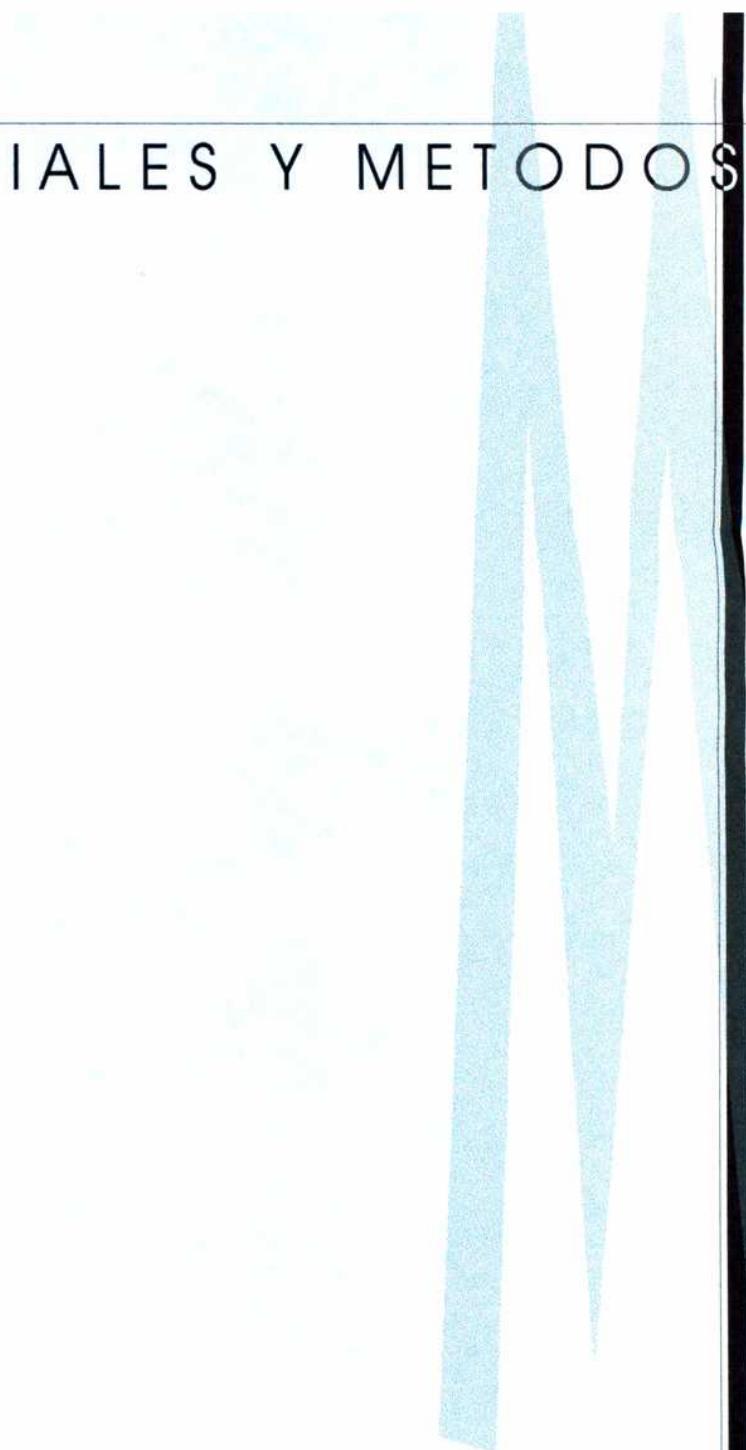
El número mínimo de *loci* es un carácter conservado para los sistemas isoenzimáticos generalmente estudiados. Las diferencias en el número de *loci* pueden ser explicadas por el fenómeno de duplicación génica y resultan sumamente interesantes para estudios filogenéticos.

Considerando la amplia gama de posibilidades y las interesantes perspectivas que ofrecen los estudios isoenzimáticos, resulta de gran interés completar la caracterización isoenzimática del género *Larrea* y de ese modo profundizar en el conocimiento de las relaciones genéticas entre las especies que lo componen.

OBJETIVOS

- Completar la caracterización isoenzimática del género mediante el estudio de una población natural de *Larrea ameghinoi*.
- Definir el status taxonómico de *L. nitida* y *L. ameghinoi* (Sección Larrea) a través del grado de divergencia genética y ocurrencia de flujo génico entre poblaciones simpátricas y alopátricas.
- Comparar los parámetros de variabilidad y patrones de estructuración dentro y entre todas las especies del género incorporando al análisis resultados obtenidos por otros autores en el mismo género (Cortés, 1987, Cortés y Hunziker, 1997).

MATERIALES Y METODOS



MATERIALES Y MÉTODOS

I. Poblaciones y Especies

Se analizó una población de *L. ameghinoi* y dos poblaciones de *L. nitida* provenientes de entre 10 y 60 Km al Sur de la localidad de San Antonio Oeste, provincia de Río Negro, Argentina. Las poblaciones de *L. nitida* se encuentran separadas por una distancia de 50 Km, estando una de ellas en simpatría con la población correspondiente a *L. ameghinoi*. A continuación se detallan el sitio de colección (Figura 3), nombre del colector de la muestra, ejemplar de herbario de referencia, fecha de colección y el número de individuos coleccionados para cada población..

- *L. ameghinoi*

LA1 Provincia de Río Negro, 60 Km al Sur de San Antonio Oeste, Ruta Nacional 3, Km 1194; col. J.H.Hunziker y J.C. Gamarro 13241 (SI) 30-III-96, 14 individuos, J. H. Hunziker 13246 (SI) 6-I-97, 20 individuos.

- *L. nitida*

LN1 Provincia de Río Negro, 60 Km al Sur de San Antonio Oeste, Ruta Nacional 3, Km 1194; col. J.H.Hunziker y J.C.Gamarro 13240 (SI) 9-III-98; 10 individuos.

LN2 Provincia de Río Negro, 10 Km al Sur de San Antonio Oeste, Ruta Nacional 3; col. J.H.Hunziker y J.C.Gamarro 13247 (SI) 22-III-97; 23 individuos.

Ia. Colección y conservación de los frutos

La elección de las plantas madre a partir de las cuales se coleccionaron los esquizocarpos se realizó en forma aleatoria, procurando no tomar muestras de individuos próximos entre sí para evitar distorsiones ocasionadas por la endogamia.

Los esquizocarpos provenientes de cada planta se introdujeron en sobres de papel independientes debidamente rotulados e identificados según arbusto madre.

Para su conservación en el laboratorio, los sobres se colocaron en recipientes herméticos en contacto con Silica Gel y almacenaron en la heladera a 4°C a fin de prevenir la pérdida de viabilidad.

I.b. Condiciones de Germinación

Con el objeto de extraer las semillas del interior de los frutos, los mericarpios constituyentes de cada esquizocarpo fueron separados para luego eliminar su pericarpio con una pinza de punta fina.

Una vez concluído este procedimiento, las semillas fueron escarificadas mecánicamente, y colocadas en remojo por el lapso de 48, 60 y 72 horas, de acuerdo con los requerimientos de cada ensayo. Para aquellos sistemas en los que fue necesario utilizar plántulas de más de tres días, las semillas fueron transferidas a cajas de Petri esterilizadas y dispuestas sobre una base de algodón embebido en agua estéril al momento de aparecer la radícula .

La determinación del estadio de desarrollo más apropiado para cada sistema se llevó a cabo experimentalmente.

En todos los casos la germinación tuvo lugar a temperatura ambiente y bajo las condiciones de luz y oscuridad determinadas por el día y la noche.

II. Electroforesis de isoenzimas

La modalidad de electroforesis empleada para la realización del presente trabajo fue la electroforesis horizontal en geles de poliacrilamida.

Los sistemas isoenzimáticos Aminopeptidasas (Amp), Alcohol deshidrogenasa (Adh), Glutamato deshidrogenasa (Gdh), Glutamato oxalacetato transaminasa (Got), 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6-Pgdh), Esterasas (Est) y Superóxido dismutasa (Sod) se seleccionaron en base a los estudios realizados previamente Cortés (1987) con el propósito de llevar a cabo futuras comparaciones dado que *L. ameghinoi* no pudo ser incluida en dicho análisis. A fin de aumentar el número de *loci*, fueron añadidos nuevos sistemas alcanzando un total de once. Los sistemas incorporados fueron Isocitrato deshidrogenasa (Idh), Shikímico deshidrogenasa (Skd), Malato Deshidrogenasa (Mdh) y Enzima Málica (Me).

Debido a las diferencias en las condiciones de desarrollo analizadas en cada sistema no fue posible utilizar un mismo individuo para todos los ensayos.

La composición de las soluciones buffer utilizadas para la preparación de los geles y corridas electroforéticas se encuentra detallada en la próxima sección

II.a. Preparación de los geles

A continuación se detalla la solución general utilizada para la preparación de los geles. Los porcentajes de acrilamida-bisacrilamida fueron establecidos de acuerdo con las características de cada sistema al igual que los buffers.

Solución Buffer	105 ml
Acrilamida	5,11 gr (5%) ó 7,15 gr (7%)
Bis-acrilamida	0,14 gr (5%) ó 0,20 gr (7%)
Diamina de N,N,N', N' tetrametiletileno (TEMED)	0,14 ml
Persulfato de Amonio	pta. espátula

Una vez finalizada su preparación, la solución se vertió en una cubeta de vidrio de 18 cm de ancho, 20 cm de largo, y 0,2 cm de espesor, y cubrió con un vidrio de las mismas dimensiones, dejándola reposar hasta concluida la polimerización al cabo de aproximadamente 1 hora.

II.b. Preparación de las muestras

Para la preparación de los homogenatos, las semillas o plántulas se colocaron en los pocillos de una placa de toque en contacto con bolsas de refrigeración a 0°C, añadiendo a cada una de ellas 35 µl del buffer de extracción (Tris - Clorídrico 0,1 M pH 7) para luego macerarlas utilizando una varilla de vidrio con extremos redondeados. Posteriormente, los homogenatos fueron absorbidos en rectángulos de papel Whatmann 3 MM pequeños (4 mm x 2 mm) ó grandes (10 mm x 2 mm) si se deseaba facilitar la interpretación..

Este procedimiento se llevó a cabo inmediatamente antes de iniciar la corrida electroforética.

Siembra de las muestras en el gel

Los rectángulos de papel Whatmann embebidos en los homogenatos fueron introducidos, con la ayuda de una pinza, en los orificios realizados en el gel mediante un peine de acero inoxidable con 20 dientes de 4mm x 2mm espaciados regularmente.

Las hendiduras fueron realizadas a 4cm del cátodo (-), aproximadamente, por ser las bandas de migración anódica (+).

El azul de Bromofenol se utilizó como marcador de frente en todas las corridas a fin de estimar la posición de las enzimas durante las mismas y para utilizarlo luego como punto de referencia para la alineación del frente.

Una vez finalizada la siembra, los geles se colocaron sobre las cubas electrolíticas, en donde fueron puestos en contacto con los electrodos, y cubiertos con una lámina de papel adherente para evitar la evaporación y calentamiento excesivo antes y durante la corrida.

II.c. Condiciones de la electroforesis

Las corridas electroforéticas fueron realizadas en heladera a 4°C a fin de evitar el calentamiento y consecuente desnaturalización de las proteínas.

Los geles, dos por cuba como máximo, fueron puestos en contacto con la solución buffer mediante paños esponja de 18x12 cm. Los geles dispuestos de esta forma en las cubas, previamente cubiertos con papel adherente, vidrio y una bandeja con hielo, fueron sometidos a un campo eléctrico al ser conectados a fuentes de poder de corriente continua a voltaje constante (100V) y amperaje variable. Las corridas se prolongaron hasta que el Azul de bromofenol alcanzó una distancia de aproximadamente 7cm a partir de la siembra. La velocidad de migración depende de las soluciones buffer utilizadas en los geles y cubas electrolíticas, por lo cual el tiempo de corrida fue variable de acuerdo con el sistema en estudio.

II.d. Revelado, fijación y preservación de los geles

Finalizada la corrida, los geles fueron retirados de la heladera y acondicionados para el revelado de la actividad enzimática eliminando los bordes para ajustarlos a las medidas de las cubetas de tinción y retirando los rectángulos de papel Whatmann de cada uno de los orificios

Una vez sumergidos en la solución de revelado correspondiente, los geles se incubaron en estufa a 37°C en completa oscuridad hasta completarse la aparición de bandas. El procedimiento fue realizado para todos los sistemas con excepción de Sod ya que éste debe ser revelado exponiendo el gel a luz intensa.

La fijación de los geles, proceso que evita la pérdida de color en la zona de actividad y previene la proliferación de hongos, se llevó a cabo enjuagando los mismos con agua

corriente y sumergiéndolos luego en una solución 5:5:1 Etanol : Agua : Ac. Acético durante 2 a 3 horas.

Los zimogramas de mejor resolución fueron fotografiados, mientras que aquellos de resolución más pobre fueron registrados en papel mediante dibujos..

Por último, cada gel se envolvió en bolsas plásticas de la medida necesaria, se rotuló con fecha y sistema, y almacenó en cajas de cierre hermético a temperatura ambiente.

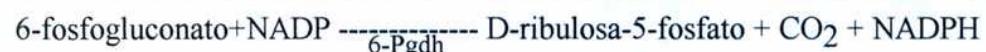
II.e. Número de clasificación y designación de las isoenzimas.

Para cada sistema isoenzimático se utilizaron los números de clasificación de las isoenzimas de acuerdo a las recomendaciones de la IUPAC-IUB.(Enzyme Nomenclature, 1984). La designación de los alelos se realizó de acuerdo al orden decreciente de velocidad de migración anódica, siendo 1 el más rápido.

II.f Sistemas Isoenzimáticos: Características y Condiciones experimentales.

- 6-fosfogluconato deshidrogenasea (6-Pgd - E.C. 1.1.1.4.3.)

-La enzima oxidoreductasa 6-fosfogluconato deshidrogenasa interviene en una de las descarboxilaciones oxidativas que forman parte de la vía de las pentosas fosfato. En plantas diploides normalmente existen dos isoenzimas: una en el citosol y otra en los plástidos.



En presencia de PMS y NADPH, el MTT se convierte en Formazán, compuesto que precipita y dá lugar a la formación de bandas de color azul.

- Buffer Geles: Deshidrogenasa pH 9.
- Buffer Corrida. Deshidrogenasa pH 9.
- Solución de Coloración

Tris ClH (0,1M) pH 7	40 ml
Acido 6-fosfoglucónico	0,05 g
NADP	0,03 g
MTT	0,03 g
PMS	pta. espátula

-Incubación en oscuridad a 37°C. Fijación

- Alcohol deshidrogenasa (Adh - E.C. 1.1.1.1)

-La enzima alcohol deshidrogenasa se encuentra ampliamente distribuida en microrganismos, plantas y animales. Esta oxidoreductasa reacciona con alcoholes primarios y secundarios, tanto alifáticos como aromáticos según:



En presencia de PMS (transportador de electrones) y NADH, el MTT se convierte en Formazán, compuesto que precipita y dá lugar a la formación de bandas de color azul.

-Buffer Geles: Tris Citrico pH 7. Proporción Buffer-Agua destilada. 1:14.

-Buffer Corrida: Tris Cítrico pH 7.

-Solución de Coloración

Tris CIH (0,5M) pH 7.1	3 ml
Agua destilada	30 ml
Etanol	3 ml
NAD	0,015 g
MTT	0,010 g
PMS	pta. espátula

-Incubación en oscuridad 37°C. Fijación.

- Aminopeptidasas (Amp - E.C. 3.4.1.2)

-Las aminopeptidasas catalizan la hidrólisis de diversos tipos de uniones peptídicos. También se las conoce bajo el nombre de dipeptidasas o tripeptidasas (Manchenko, 1994).

Durante la tinción el sustrato, L-leucyl-B-naftilamida, se transforma en L-leucina para formar un complejo con la sal Fast Black y dando bandas de color rojo en la zona de actividad.

-Buffer Geles: Borato de Litio pH 8,3 -Tris Cítrico pH 8,3. Proporción 1:10.

-Buffer Corrida: Borato de Litio pH 8,3..

-Solución de Coloración: Mezcla compuesta por las soluciones 1 y 2. La preparación debe realizarse en el momento del revelado.

Solución 1

Fast Black K Salt	0.03 gr.
Fast Garnet GBC	pta. de espátula
Solución NaOH (0.31M)	50 ml
Solución NaOH-Maleico (0.2 y 0.17M)	10 ml

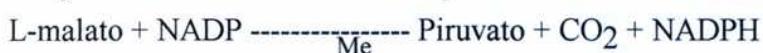
Solución 2

L-leucil-B-naftil-amida	0.07 gr.
Metanol 10%	10 ml

-Incubación en oscuridad 37°C. Fijación.

- Enzima Málica (ME - E.C 1.1.1.40)

-La enzima málica es una óxidoreductasa también conocida como malato deshidrogenasa dependiente de NADP. Puede ser encontrada en animales, vegetales, microrganismos y hongos con localización tanto citoplasmática como mitocondrial.



En presencia de PMS y NADPH, el NBT se convierte en Formazán, compuesto que precipita y dá lugar a la formación de bandas de color azul.

-Buffer Geles: Tris Citrico pH 7. Proporción Buffer-Agua destilada. 1:14.

-Buffer Corrida: Tris Cítrico pH 7.

Solución de Coloración

Tris CIH (0,1M) pH 8,4	10 ml
Agua destilada	37,5 ml
Sustrato Málico	2,5 ml
Cl ₂ Mg 1%	0,5 ml
NADP	0,01 g
NBT	0,01 g
PMS	pta. espátula

-Incubación en oscuridad a 37°C. Fijación.

- Esterasas (Est - E.C. 3.1.1.)

-Las esterasas son consideradas hidrolasas ya que participan de la hidrólisis de las uniones ésteres. Pertenece a un grupo complejo y heterogéneo de enzimas de amplia especificidad por sustratos artificiales.



En presencia de Fast Blue RR el α-naftol precipita formando bandas de coloración marrón oscura, mientras que el β-naftol da lugar a bandas de color rojizo.

-**Buffer Geles:** Tris Maleico pH 7,4. Proporción Buffer-Agua destilada. 1:10.

-**Buffer Corrida:** Tris Maleico pH 7,4.

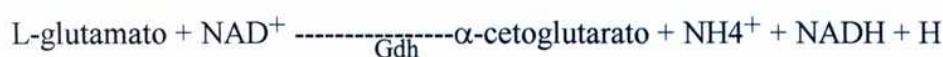
-**Solución de Coloración**

Tris CIH (0,5M) pH 7.1	10 ml
Agua destilada	87 ml
α-naftilacetato	0,030 g
β-naftilacetato	0,030 g
Acetona	6 ml (1 ml de Acetona cada 0,01g de sustrato)
Fast Blue RR Salt	0,100 g

-Incubación en oscuridad a 37°C. Fijación.

- Glutamato deshidrogenasa (Gdh - E.C. 1.4.1.2)

-La enzima glutamato deshidrogenasa ligada a la piridina cataliza la desaminación oxidativa del glutamato, descargando los grupos amino recogidos de los demás aminoácidos en forma de NH₄⁺.



En presencia de PMS y NADH, el MTT se convierte en Formazán, compuesto que precipita y dá lugar a la formación de bandas de color azul

-**Buffer Geles:** Tris Citrico pH 7. Proporción Buffer-Agua destilada. 1:14.

-**Buffer Corrida:** Tris Cítrico pH 7.

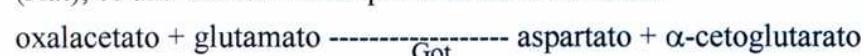
-**Solución de Coloración**

Tris CIH (0,5M) pH 7.1	12 ml
Agua destilada	20 ml
Glutamato de Sodio	2,000 g
NAD	0,015 g
MTT	0,010 g
PMS	pta. espátula

-Incubación en oscuridad a 37°C. Fijación.

- Glutamato Oxalacetato Transaminasa (Got - E.C. 2.6.1.1.) (=Aat)

-La glutamato oxalacetato transaminasa, también llamada aspartato amino transferasa (Aat), es una transaminasa que cataliza la reacción:



El oxalacetato reacciona con la sal Fast Blue BB dando un precipitado oscuro en la zona de actividad.

-Buffer Geles: Borato de Litio pH 8,3 -Tris Cítrico pH 8,3. Proporción 1:10.

-Buffer Corrida: Borato de Litio pH 8,3..

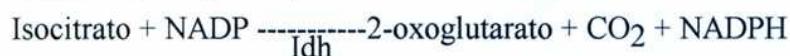
-Solución de Coloración

Fosfato de Sodio Monobásico 0,2M	8 ml
Fosfato de Sodio Dibásico 0,2 M	42 ml
Fast Blue BB Salt	0,150 g
Piridoxal-5-P	0,001 g
Ac. L-aspártico	0,225 g
Ac. α -cetoglutárico	0,050 g
PVP 40	0,125 g

-Incubación en oscuridad a 37°C. Fijación.

- Isocitrato Deshidrogenasa (Idh - E.C. 1.1.1.42)

-La isocitrato deshidrogenasa es una enzima cuya actividad está presente en bacterias, hongos, plantas, protozoos, invertebrados y vertebrados. Se trata de una oxidoreductasa que requiere de Magnesio para catalizar la reacción:



En presencia de PMS y NADPH, el NBT se convierte en Formazán, compuesto que precipita y dá lugar a la formación de bandas de color azul.

-Buffer Geles: Tris Cítrico pH 7. Proporción Buffer : Agua destilada 1:10

-Buffer Corrida: Tris Cítrico pH 7.

-Solución de Coloración

Tris ClH (0,01M) pH 8	30 ml
Cl ₂ Mg 10%	1,0 ml
MTT	0,008 g
NADP	0,010 g
Isocitrato	0,040 g
PMS	0,010 g

-Incubación en oscuridad a 37°C. Fijación.

- Malato deshidrogenasa (Mdh - E.C. 1.1.1.37)

-La enzima malato deshidrogenasa es una oxidoreductasa presente en varios compartimentos celulares capaz de interconvertir el oxalacetato en malato cualquiera sea su localización. La reacción se produce en una amplia variedad de organismos.



En presencia de PMS y NADH, el MTT se convierte en Formazán, compuesto que precipita y dá lugar a la formación de bandas de color azul

-Buffer Geles: Tris Cítrico pH 7. Proporción Buffer-Agua destilada. 1:14.

-Buffer Corrida: Tris Cítrico pH 7.

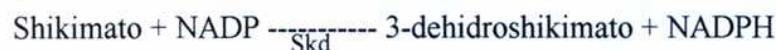
-Solución de Coloración

Tris ClH (0,1M) pH 7.1	5 ml
Agua destilada	40 ml
Sustrato Málico	5 ml
NAD	0,025 g
MTT	0,015 g
PMS	pta. espátula

-Incubación en oscuridad a 37°C. Fijación.

- Shikimico Deshidrogenasa (Skd- E.C. 1.1.1.25)

-La enzima shikímico deshidrogenasa se encuentra presente únicamente en bacterias y plantas. Se trata de una oxidoreductasa que interviene en la reacción:



En presencia de PMS y NADH, el MTT se convierte en Formazán, compuesto que precipita y dá lugar a la formación de bandas de color azul

-Buffer Geles: Tris Cítrico pH 7. Proporción Buffer : Agua destilada 1:10

-Buffer Corrida: Tris Cítrico pH 7.

-Solución de Coloración

Tris ClH (0,01M) pH 9	30 ml
Cl ₂ Mg 1%	0,5 ml
MTT	0,006 g
NADP	0,003 g
SK acid	0,015 g
PMS	0,010 g

-Incubación en oscuridad a 37°C. Fijación.

- Superóxico Dismutasa (Sod - E.C. 1.15.1.1)

-Las superóxido dismutasas se hallan presentes en gran número de organismos aeróbicos y parecen desempeñar un papel esencial en la defensa contra la toxicidad potencial del oxígeno molecular. Estas enzimas comprenden una clase de metaloproteínas que catalizan la reacción de óxido reducción asimétrica en la que dos radicales superóxido dan peróxido de hidrógeno y oxígeno:



En presencia de luz y PMS, el MTT se convierte en Formazán originando un precipitado azul y produciendo O₂. La superóxido dismutasa reacciona con el formazán y con el O₂ liberado, regenerando el MTT. Las zonas donde se produce la reacción se observan como bandas claras sobre el fondo azul.

- Buffer Geles: Tris Citrico pH 7.4
- Buffer Corrida: Borato de Sodio pH 8.7
- Solución de Coloración

Tris ClH (0,1M) pH 8.5	100 ml
NBT	0,02g
PMS	pta. espátula

-Exposición a la luz a temperatura ambiente.

II.g. Soluciones Buffer utilizadas en la preparación de geles y cubas electroforéticas

Las soluciones buffer detalladas en orden alfabético en la lista a continuación fueron utilizadas en la preparación de los geles, en las cubas electrolíticas durante la corrida y en las soluciones de coloración.

Borato de Litio pH 8.3 (Buffer A -Scandalios, 1969)

Hidróxido de Litio	1,20 g
Acido Bórico	11,89 g
Agua Destilada	1000 ml

Borato de Sodio ph 8.7 (Poulik, 1957)

Acido Borico	18,6 g
Hidróxido de Sodio	4,00 g
Agua Destilada	1000 ml

Deshidrogenasa pH 9 (Schaal y Anderson, 1974)

Tris	10,540 g
Acido Bórico	0,270 g
EDTA	0,410g
Agua destilada	1000 ml

Tris Cítrico pH 7 (Shaw y Prasad, 1970)

Tris	16,400 g
Acido Cítrico	9,456 g
EDTA 2 NA	0,446 g
Agua destilada	1000 ml

Tris Cítrico pH 7.4 (Poulik, 1957)

Tris	1,84 g
Acido Cítrico	0,77 g
Agua destilada	1000 ml

Tris Citrico pH 8.3 (Buffer B - Scandalios, 1969)

Tris	6,20 g
Acido Cítrico	1,60 g
Agua destilada	1000 ml

Tris Maleico pH 7.4 (Shaw y Prasad, 1970)

Tris	12,100g
Acido Maleico	11,600g
EDTA	3,725g
Cloruro de Magnesio	1,525g
Agua destilada	1000 ml

III. Determinación de los probables *loci* y alelos

En cualquier tipo de estudio donde sea utilizada la electroforesis, el control genético de las isoenzimas debe ser investigado cuidadosamente. El método más preciso implica el análisis genético de individuos con distintas movilidades electroforéticas y la verificación de los patrones presentados por la progenie de la primera y segunda generación.

Debido a que el ciclo de vida de estas plantas es largo, y ante la imposibilidad de hacer cruzamientos, en el presente estudio no se ha podido llevar a cabo ningún análisis genético de la herencia de las isoenzimas. Por ello, cuando fue posible, se emplearon otros métodos

para poder individualizar los probables genes y estimar los alelos implicados en los sistemas analizados.

i) Comparación de la velocidad de migración relativa de las bandas: la misma velocidad de migración relativa es un indicio de homología entre bandas. Sin embargo, como pueden existir diferentes isoenzimas con la misma velocidad de migración, existe cierta limitación en este criterio.

ii) Comparación de los patrones de diferentes individuos de cada población y/o entre poblaciones de la misma especie, tratando de analizar individuos homocigotas y/o heterocigotas a nivel diploide para los diferentes posibles genes y alelos.

iii) Análisis de la aparición y/o desaparición de las bandas y variación de sus intensidades a lo largo del desarrollo de un individuo, lo cual permitiría en la mayoría de los casos, postular los posibles genes implicados en la producción de ciertas isoenzimas, ya que se espera que alelos de un mismo gen estén sujetos al mismo sistema de regulación, y, por lo tanto, sufran las mismas modificaciones a lo largo del desarrollo (Ohno, 1970, Smith-Cavalli, 1976, Zouros *et al*, 1982). Por otra parte, varios investigadores como Johnson *et al* (1968), McReynolds (1967) y otros, han observado que existiría concordancia entre la determinación de las homologías de las isoenzimas por el estudio de sus propiedades catalíticas y las especificidades tisulares con el método de análisis genético.

iv) Reacción de ciertas isoenzimas frente a diferentes sustratos *in vitro*, ya que las isoenzimas codificadas por alelos de un mismo gen deberían reaccionar frente a los mismos sustratos (Zouros *et al*, 1968, Macdonald y Brewbaker, 1972, Scandalios y Espiritu, 1979).

v) Comparación de la variación de velocidad relativa de las bandas al cambiar la concentración del gel: la igualdad de esta variación sería indicio de homología, ya que podría estar indicando similitudes en el tamaño molecular de las isoenzimas.

IV. Análisis estadístico

Los datos electroforéticos se analizaron utilizando el programa Biosys1-7 (Swoford y Selander, 1981). La matriz básica de datos se construyó a partir de las frecuencias genotípicas observadas en todos los locus para cada una de las poblaciones estudiadas.

IV. a. Equilibrio de Hardy - Weinberg

Se realizó una prueba χ^2 de bondad y ajuste para cada uno de los locus a fin de determinar si las poblaciones se hallaban en equilibrio de Hardy Weinberg.

En los casos en donde existían más de dos variantes alélicas para un locus y la frecuencia esperada de los alelos menos frecuentes era demasiado baja, los individuos eran redistribuidos en las siguientes categorías: i)homocigotas para el alelo más frecuente, ii)heterocigotas para el alelo más frecuente y alguno de los otros alelos, iii)cualquier otro genotipo. En estas condiciones, la prueba era nuevamente efectuada con un grado de libertad (Swoford y Selander, 1981).

IV. b. Variabilidad genética

Los parámetros utilizados como estimadores de la variabilidad genética fueron cuatro: porcentaje de *loci* polimórficos (P), heterocigosis media esperada por locus (H_e), número efectivo de alelos (n_e) y número promedio de alelos por locus (n). Éstos fueron determinados tanto a nivel poblacional como específico.

Porcentaje de loci polimórficos (P)

Los cálculos fueron efectuados utilizando dos criterios de polimorfismo diferentes. Un locus fue considerado polimórfico cuando: i) la frecuencia del alelo más frecuente era menor o igual a 0.99, ii)la frecuencia del alelo más frecuente era menor o igual a 0.95.

$$P = (\text{Nro. de } loci \text{ polimórficos} / \text{Nro total de } loci) \times 100$$

Heterocigosis media esperada por locus (H_e)

La heterocigosis fue calculada a partir de las frecuencias alélicas utilizando el método descripto por Nei (1987)

$$H_e = (1/L) \sum 1 - \sum x_i^2$$

Donde

L=número de *loci* analizados

x_i = frecuencia de los i-alelos

Siendo

$$0 < H_e < 1$$

Si se promedian los valores de H_e sobre diferentes poblaciones de una especie se obtiene la heterocigosis poblacional promedio (H_{ep}). En cambio, si se realiza un promedio de las frecuencias en las diferentes poblaciones y luego se calcula H_e de acuerdo con la expresión dada, el valor resultante es la heterocigosis promedio a nivel de especie (H_{es}).

Número efectivo de alelos (n_e)

El número efectivo de alelos alcanza su valor máximo cuando las frecuencias alélicas dentro de un locus son equivalentes y un valor mínimo cuando un alelo está fijado.

Kimura y Crow (1964)

$$n_e = 1/\sum x_i^2$$

Donde,

x_i = frecuencia del alelo i

El n_e puede ser promediado para todos los *loci* estudiados para lo cual se calcula como:
 $1/(1-H_e)$.

Número promedio de alelos por locus (A)

Este valor se obtiene promediando el número de alelos presentes en cada uno de los locus analizados.

IV.c. Estructura poblacional

La estructura genética de las poblaciones fue analizada por medio de los índices de Fijación: F_{IS} , F_{IT} y F_{ST} (Wright 1965, 1978).

Donde,

- F_{IS} es una medida del efecto del apareamiento no aleatorio dentro de las subpoblaciones.

- F_{ST} es una medida del efecto de la subdivisión de la población.

- F_{IT} es una medida del exceso o defecto de homocigotas en la población total.

Nei (1977) ha mostrado que los estadísticos F pueden ser reformulados y definidos como una función de las heterocigosis observada y esperada. De acuerdo con las correcciones propuestas por Nei y Chesson (1983) los índices pueden estimarse como:

$$\boxed{\begin{aligned} F_{IS} &= 1 - H_O / H_S \\ F_{IT} &= 1 - H_O / H_T \\ F_{ST} &= 1 - H_S / H_T \end{aligned}}$$

El flujo génico (Nm) se calculó a partir de los índices F_{ST} de Wright (1978) según la fórmula:

$$\boxed{Nm = 1 - F_{ST} / 4F_{ST}}$$

IV.d. Diferenciación Genética

La identidad genética media (I) (Nei, 1972) es tomada como medida relativa del grado de similitud entre poblaciones:

$$\boxed{I = 1/L \cdot \sum (\Sigma x_{ij} y_{ij}) / (\Sigma x_{ij}^2 \cdot \Sigma y_{ij}^2)^{1/2}}$$

Donde,

L = número de *loci* analizados

x_{ij} = frecuencia del alelo i correspondiente al locus j en la población x .

y_{ij} = frecuencia del alelo i correspondiente al locus j en la población y .

Según lo propuesto por Nei (1975), las relaciones entre poblaciones también pueden expresarse como distancias genéticas (D) ya que éstas constituyen una medida de la diferenciación genética entre ellas:

$$\boxed{D = - \ln I}$$

Los índices de similitud y distancia genética fueron calculados según Nei (1978), fórmula que introduce las correcciones para muestras pequeñas.

IV. e. Análisis de agrupamiento

A partir de las distancias genéticas se construyó un fenograma por el método de agrupamiento de medias no ponderadas (UPGMA) (Sneath y Sokal, 1973) representando las relaciones entre las poblaciones estudiadas.

R E S U L T A D O S

RESULTADOS

Sistemas isoenzimáticos

Los 11 sistemas isoenzimáticos descriptos en Materiales y Métodos representaron un total de 31 probables *loci*. Trece de ellos fueron monomórficos y presentaron la misma variante alélica tanto en la población de *L. ameghinoi* como en las dos poblaciones de *L. nitida*.

Se detectaron tres *loci* diagnósticos (Adh-1, Gdh-1, Mdh-1) en donde se observó la fijación de variantes electroforéticas diferentes para cada especie. Los restantes *loci* fueron polimórficos en al menos una de las poblaciones analizadas.

I. Descripción de los patrones electroforéticos

- 6-Fosfogluconato deshidrogenasa (6-Pgdh)

La actividad enzimática fue estudiada en semillas remojadas durante 48 hs. después de iniciada la germinación. La maceración fue realizada utilizando la semilla completa debido a la dificultad de separar los distintos órganos dado su reducido tamaño.

El análisis de los zimogramas ha permitido diferenciar una zona de actividad 6-Pgdh, denominada 6-Pgdh-1, correspondiente a un único locus (6-Pgdh-I). Para la resolución de este sistema fue necesario emplear geles al 7%, 10% y 12%, debido a la proximidad entre los diferentes electromorfos.

Los patrones fenotípicos observados coinciden con interpretaciones previas que proponen una estructura dimérica para esta enzima en las restantes especies del género *Larrea* (Cortés, 1987), y en otros miembros de la familia Zygophyllaceae, como *Bulnesia* (Hunziker y Schaal, 1983, Comas y Hunziker, 1996).

La figura 4 corresponde a la representación esquemática de las variantes electroforéticas observadas para cada especie. Cada uno de las alternativas alélicas propuestas ha sido numerada según el orden decreciente de la distancia de migración anódica alcanzada desde su punto de origen.

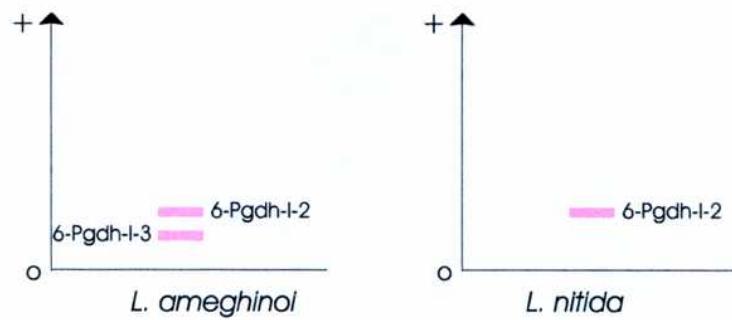


Figura 4. 6-Pgdh-1: Representación esquemática de las variantes electroforéticas
Punto de origen (o) - Anodo (+)

En la población de *L. ameghinoi*, todos los individuos presentaron una banda como mínimo y tres como máximo. Los fenotipos hallados sugieren que 6-Pgdh-1 estaría codificada por un gen con dos alelos codominantes. La banda de velocidad intermedia en los individuos cuyo fenotipo electroforético es de tres bandas, sería el resultado de la asociación al azar de los monómeros codificados por cada uno de los dos alelos que se encuentran en los heterocigotas.

La variante de mayor movilidad electroforética fue denominada 6-Pgdh-I-2, la de menor movilidad electroforética, 6-Pgdh-I-3, respetando la designación establecida por Cortés (1987). La frecuencia de individuos heterocigotas fue marcadamente inferior a la de los homocigotas.

Dentro del género *Larrea*, la existencia de polimorfismo en este locus es una característica compartida únicamente con *L. divaricata*, especie en la que se ha descripto además, una tercera variante llamada 6-Pgdh-I-1 (Cortés y Hunziker, 1997).

Los individuos de *L. nitida* provenientes de las dos poblaciones analizadas presentaron tan sólo una banda correspondiente a la variante 6-Pgdh-I-2. Estos resultados son coincidentes con lo encontrado por Cortés (1987) en cuatro poblaciones de *L. nitida* originarias de Salta, Mendoza y Chubut.

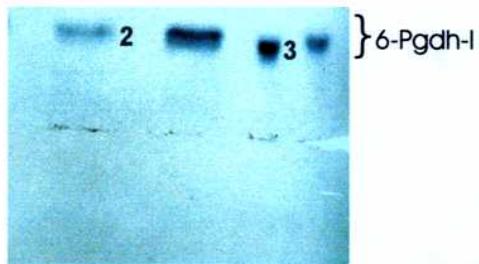


Fig.5. Zimograma de 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6-Pgdh)

Tabla 1. Frecuencias alélicas para el sistema 6-Pgdh

	Población		
	LA1	LN1	LN2
6-Pgdh-I-2	0.411	1.000	1.000
6-Pgdh-I-3	0.589	-	-
N	101	62	61

- Alcohol deshidrogenasa (Adh)

La zona de actividad Adh resultó más intensamente coloreada al utilizar como fuente de proteínas semillas de 48 hs. después de iniciada la germinación. Además de las variaciones en la actividad relacionadas con el estadio de desarrollo, el sistema resultó sensible a la inhibición por sustrato, desapareciendo toda actividad al agregar volúmenes excesivos de etanol en la solución de coloración.

En las tres poblaciones analizadas se identificó una única zona de actividad Adh, producto del locus denominado Adh-I .

Los patrones electroforéticos observados en el presente análisis no permiten hacer inferencias acerca de las características estructurales de la enzima. Sin embargo, estudios previos realizados en varias especies del género (*L. divaricata*, *L. tridentata* y *L. nitida*)

indican que se trataría de una enzima dimérica codificada por un gen con tres alelos codominantes que han sido llamados Adh-I-1, Adh-I-2 y Adh-I-3 de acuerdo al orden decreciente de movilidad electroforética (Cortés, 1987, Cortés y Hunziker, 1997). Este tipo de estructura también ha sido verificada para el género *Bulnesia* (Comas y Hunziker, 1996).

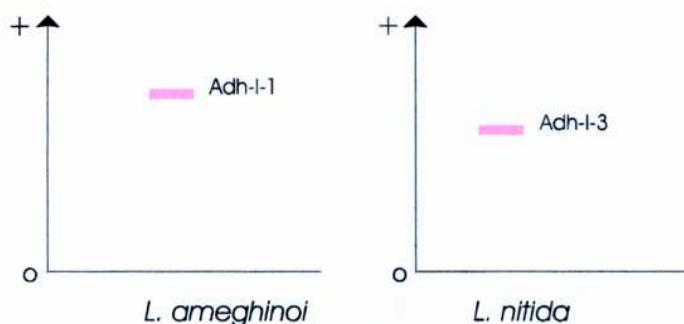


Fig.6. Adh- Representación esquemática de las variantes electroforéticas
Punto de origen (o) - Anodo (+)

En todos los individuos de la población de *L. ameghinoi* se observó una única banda correspondiente a la variante Adh-I-1, tratándose por lo tanto de un locus monomórfico. La frecuente aparición de bandas efímeras sin un patrón fijo pudo ser atribuída a la formación de variantes conformacionales producto de la alteración de las enzimas durante la preparación del homogenato y pasos sucesivos. Este hecho fue confirmado al sembrar muestras por duplicado y observarse la aparición de las bandas conformacionales sólo en una de las réplicas.

En las poblaciones de *L. nitida* el locus Adh-I fue asimismo monomórfico, sin embargo, a diferencia de observado para *L. ameghinoi*, la variante alélica hallada en este caso fue Adh-I-3.

La fijación de variantes alélicas diferentes en estas especies convierte a Adh-I en un locus diagnóstico de potencial utilidad en la detección de híbridos e introgresantes dentro de la Sección Larrea.

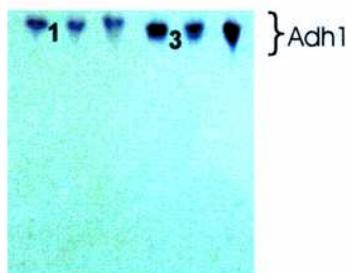


Fig.7. Zimograma correspondiente al sistema Adh.

Tabla 2. Frecuencias alélicas para el sistema Adh

	Población		
	LA1	LN1	LN2
Adh-I-1	1.000	-	-
Adh-I-2	-	-	-
Adh-I-3	-	1.000	1.000
N	149	60	65

- Aminopeptidasas (AMP)

El sistema AMP fue estudiado utilizando semillas remojadas de 72 hs. de iniciada la germinación.

El análisis de los zimogramas permitió identificar dos zonas de actividad, atribuyéndose cada una de ellas a un único locus. Dichos *loci* fueron denominados AMP-I y AMP-III, respetando la nomenclatura establecida por Cortés (1987).

Las aminopeptidasas fueron estudiadas únicamente en la población LA1, utilizándose algunos individuos de LN1 como marcadores de referencia.

Los patrones electroforéticos observados sugieren que la enzima funcional estaría compuesta por un solo polipéptido. Estos resultados coinciden con lo propuesto para las

restantes especies del género (Cortés, 1987, Cortés y Hunziker, 1997), para otros géneros de la familia Zygophyllaceae (Comas y Hunziker, 1996) y para diversas especies vegetales (Scandalios y Espiritu, 1969; Gottlieb, 1973; Rudin, 1977; Tigerstedt, 1974; Bessega, 1997).

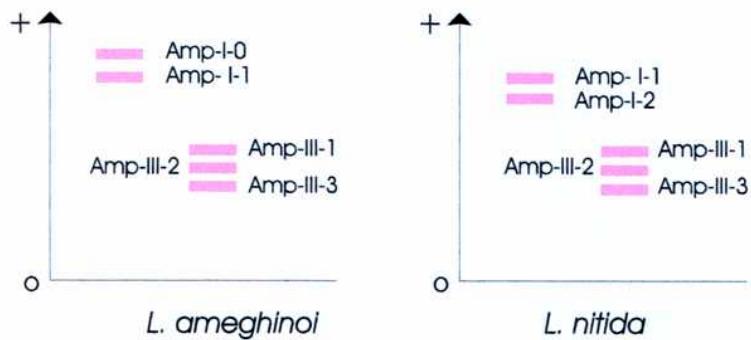


Fig.8. Amp- Representación esquemática de las variantes electroforéticas
Punto de origen (o) - Anodo (+)

Todos los individuos provenientes de LA1 presentaron en ambos *loci* una banda, como mínimo, y dos, como máximo. Los resultados obtenidos indican que el locus AMP-I estaría codificado por un gen con tres alelos codominantes denominados AMP-I-0, AMP-I-1 y AMP-I-2, adecuando la numeración a la designación establecida por Cortés para la Sección Larrea. De acuerdo con la interpretación propuesta, las únicas variantes presentes en LA1 serían AMP-I-0 y AMP-I-1, encontrándose los tres posibles fenotipos esperados.

Las seis clases de fenotipos registrados para el locus AMP-III coinciden con lo esperado para un gen con tres variantes alélicas. Estas fueron llamadas: AMP-III-1, AMP-III-2 y AMP-III-3 según el orden decreciente de velocidad de migración anódica.

A diferencia de lo observado para la mayoría de los *loci* polimórficos analizados, tanto AMP-I como AMP-III presentan una elevada proporción de heterocigotas. Este hecho se repite en las poblaciones de *L. nitida* analizadas por Cortés (1987).

El locus AMP-III descripto para la Sección Larrea sería homólogo al locus del mismo nombre en la Sección Bifolium (Cortés, 1987), en donde el número de heterocigotas fue también superior a lo observado en otros *loci*.

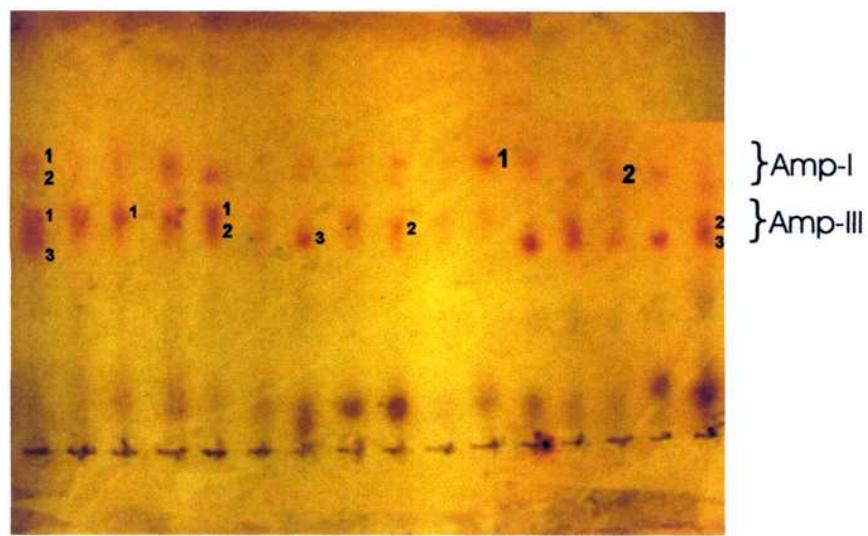


Fig.9. Zimograma correspondiente al sistema Amp.

Tabla 3. Frecuencias alélicas para el sistema Amp

	Población		
	LA1	LN1	LN2
Amp-I-0	0.475	-	-
Amp-I-1	0.525	-	-
<u>Amp-I-2</u>	<u>0.000</u>	-	-
N	59	-	-
Amp-III-1	0.408	-	-
Amp-III-2	0.382	-	-
<u>Amp-III-3</u>	<u>0.211</u>	-	-
N	38		

- Enzima Málica (ME)

Para el análisis de este sistema se utilizaron semillas de 72 hs. de iniciada la germinación, estadio durante el cual se evidenció la mayor actividad. Largos períodos de incubación en contacto con la solución de tinción fueron necesarios para alcanzar la intensidad de coloración adecuada para el registro de datos.

Se identificaron dos zonas de actividad ME de migración anódica que fueron denominadas ME-1 y ME-2. Sin embargo, sólo fue interpretada aquella cuya aparición fue constante (ME-1). La presencia de una y dos zonas de actividad ha sido documentada en otras especies vegetales por Karihaloo y Gottlieb (1995) y Pedrola-Monfort *et al* (1996).

observándose bajos niveles de polimorfismo. Los resultados obtenidos en este análisis no han permitido establecer la estructura de la proteína en el género *Larrea* por presentar una única variante fija en las tres poblaciones en las que fue estudiada.

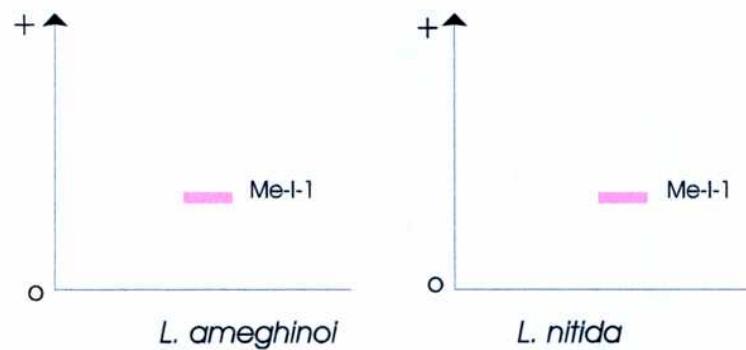


Fig.10. Me. Representación esquemática de las variantes electroforéticas (o) origen - (+) ánodo.

La totalidad de los individuos provenientes de la población de *L.ameghinoi* presentó una sola banda en la zona ME-1. De acuerdo estos zimogramas dicha zona estaría codificada por un gen con un único alelo de migración anódica (ME-I-1). Este mismo patrón fue encontrado en las poblaciones de *L. nitida*, en donde también se halló la variante ME-I-1.

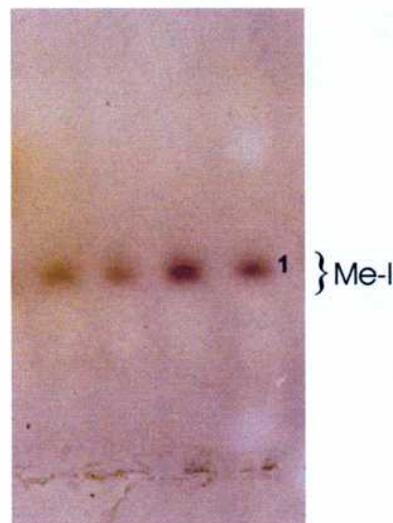


Fig.11. Zimograma correspondiente al sistema ME

Tabla 4. Frecuencias alélicas para el sistema ME

	Población		
	LA1	LN1	LN2
ME-I-1	1.000	1.000	1.000
N	54	57	50

- Esterasas (Est)

El estudio del sistema Esterasas fue realizado en semillas remojadas de 72 horas de iniciada la germinación.

El análisis de los zimogramas obtenidos para este sistema permitió diferenciar varias zonas de actividad esterasa con afinidad tanto por α como por β -naftilacetato. Dos de las cuatro zonas incluidas en este estudio presentaron migración anódica (Est-1 y Est-2), en tanto que las dos restantes fueron de migración catódica (Est-3 y Est-4). Cada una de ellas estaría codificada por un gen que fue denominado Est-I, Est-II, Est-III y Est-IV, respectivamente.

Los patrones electroforéticos obtenidos indican que la enzima tendría estructura monomérica en concordancia con lo observado en las especies de la sección *Bifolium* (Cortés, 1987), y en diferentes especies de *Cucurbita* (Wall y Whitaker, 1971), *Pinus* (Rasmussen y Rudin, 1971) y *Prosopis* (Saidman y Naranjo, 1982; Bessegia, 1997).

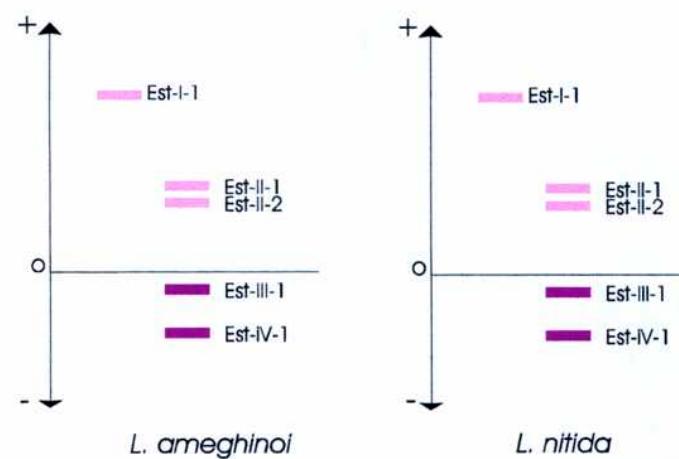


Fig.12. Est. Representación esquemática de las variantes electroforéticas
(o) origen - (+) ánodo.

El locus Est-I resultó monomórfico presentando una única banda idéntica en todos los individuos analizados pertenecientes tanto a LA1, como a LN1 y LN2.

Los dos electromorfos presentes en locus Est-II fueron denominados Est-II-1 y Est-II-2 en orden decreciente de migración anódica. Los tres fenotipos esperados para un locus bialélico fueron hallados en cada una de las poblaciones estudiadas. De acuerdo con esta interpretación los individuos con dos bandas serían heterocigotas. El alelo Est-II-1 fue el más frecuente en las poblaciones de *L. nitida*, pero no así en la de *L. ameghinii*.

Los loci Est-III y Est-IV resultaron monomórficos, presentando la misma alternativa alélica en las tres poblaciones. El locus Est-IV no fue utilizado para el cálculo de distancias y parámetros de variabilidad por tratarse de una muestra demasiado pequeña.

Los loci Est-I y Est-II corresponden a los denominados Est-II y Est-III en las poblaciones de *L. nitida* estudiadas por Cortés (1987).

El análisis de las homologías entre Secciones reveló que la variante Est-II-1 de la Sección Larrea sería coincidente con el alelo Est-III-V descripto para *Bifolium*.

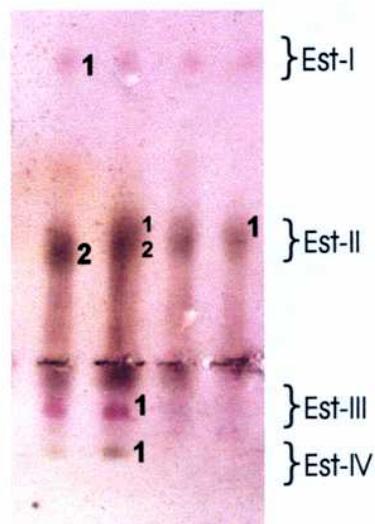


Fig 13. Zimograma correspondiente al sistema Est

Tabla 5. Frecuencias alélicas para el sistema Est

	Población		
	LA1	LN1	LN2
Est-I-1	1.000	1.000	1.000
N	34	54	68
Est-II-1	0.052	0.570	0.589
Est-II-2	0.948	0.430	0.411
N	86	71	90
Est-III-1	1.000	1.000	1.000
N	63	58	77
Est-IV-1	1.000	1.000	1.000
N	18	21	37

- Glutamato deshidrogenasa (Gdh)

La actividad enzimática fue estudiada en semillas remojadas durante 48 hs. después de iniciada la germinación.

El análisis de los zimogramas permitió diferenciar tres zonas de actividad Gdh, denominadas Gdh-1, Gdh-2 y Gdh-3 codificadas por los locus Gdh-I, Gdh-II y Gdh-III. El locus Gdh-II no fue incluído en el estudio debido a la irregularidad y baja frecuencia de su aparición.

El número de polipéptidos que conforman la enzima funcional no pudo ser determinado a través de los patrones fenotípicos observados en el locus Gdh-I. Paralelamente, los datos proporcionados por el análisis del locus Gdh-III coinciden con interpretaciones previas que proponen una estructura dimérica para estas enzimas en las restantes especies del género *Larrea* (Cortés, 1987, Cortés y Hunziker, 1997), y en otros miembros de la familia Zygophyllaceae (Hunziker y Schaal, 1983; Comas y Hunziker, 1996).

La figura 14 corresponde a la representación esquemática de las variantes alélicas observadas en las dos especies estudiadas. Cada una de las variantes alélicas propuestas ha sido numerada según el orden decreciente de la distancia de migración anódica alcanzada desde su punto de origen.

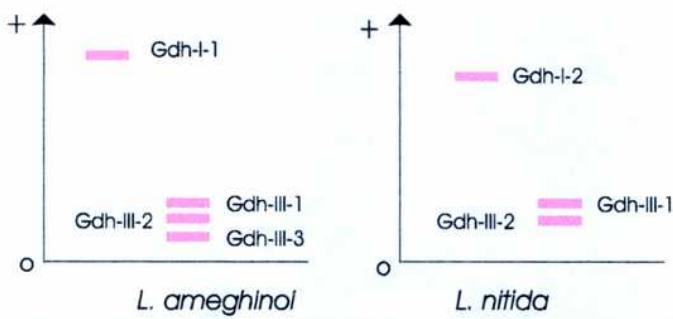


Fig. 14. Gdh-1: Representación esquemática de las variantes electroforéticas

Punto de origen (o) - Anodo (+)

En la población de *L. ameghinoi*, LA1, el locus Gdh-I resultó monomórfico presentando todos los individuos analizados una única banda correspondiente a la condición homocigota para la variante alélica denominada Gdh-I-1. La homología con el alelo del mismo nombre descripto para las especies de la Sección Bifolium, donde se encontraron además las variantes Gdh-I-2 y Gdh-I-3, ha sido verificada mediante el análisis electroforético. Las frecuencias más altas de la alternativa rápida fueron registradas en las poblaciones de *L. cuneifolia*, mientras que en las de *L. divaricata* alcanzaron valores intermedios, siendo prácticamente nulos en las poblaciones diploides de *L. tridentata* (Cortés y Hunziker, 1997).

La totalidad de los individuos provenientes de las poblaciones de *L. nitida* exhibieron una única banda de movilidad electroforética menor a Gdh-I-1, designada Gdh-I-2. Este locus también fue monomórfico para dicha variante alélica en las cinco poblaciones de *L. nitida* previamente analizadas por Cortés (1987).

Considerando los resultados obtenidos, Gdh-I podría ser incluido dentro de la nómina de loci diagnósticos que permiten diferenciar bioquímicamente las especies pertenecientes a la Sección Larrea.

De acuerdo con las interpretaciones realizadas por Cortés (1987), el locus Gdh-II, representaría un carácter diagnóstico de la Sección Bifolium. Durante el presente estudio, sin embargo, fue constatada la existencia de actividad en esta zona, tanto en la población de *L. ameghinoi* como en *L. nitida* (LN1), aunque no fue posible computar frecuencias debido al bajo número de individuos. La irregularidad de su aparición, probablemente ligada a un corto período de expresión, podría explicar dichas discrepancias.

En relación a Gdh-III, todos los individuos de la población LA1 presentaron una banda como mínimo y tres como máximo. Los zimogramas obtenidos sugieren que Gdh-III estaría codificada por un gen con tres alelos codominantes: Gdh-III-1, Gdh-III-2 y Gdh-III-3.

Del mismo modo los fenotipos electroforéticos hallados en los individuos provenientes de ambas poblaciones de *L. nitida* concuerdan con lo esperado para un gen con dos variantes alélicas, en donde la presencia de una única banda se atribuye al genotipo homocigota, mientras que en los heterocigotas es posible identificar tres bandas con intensidad 1:2:1. En este caso, los alelos encontrados fueron Gdh-III-1 y Gdh-III-2, siendo este último el alelo más frecuente en las tres poblaciones analizadas.

El locus Gdh-III se caracterizó por ser frecuentemente polimórfico en todas las especies del género previamente estudiadas, en donde las únicas variantes descriptas fueron Gdh-III-1 y Gdh-III-2. El electromorfo de menor movilidad electroforética Gdh-III-3 constituiría un alelo exclusivo de la población LA1.

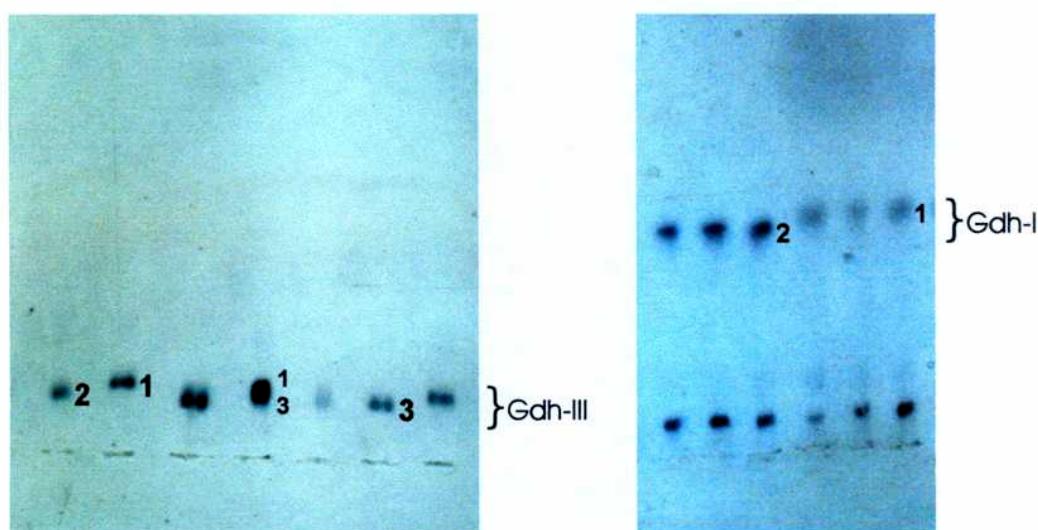


Fig 15. Zimograma correspondiente al sistema Gdh.

Tabla 6. Frecuencias alélicas para el sistema Gdh

	Población		
	LA1	LN1	LN2
Gdh-I-1	1.000	-	-
Gdh-I-2	-	1.000	1.000
N	157	77	89
Gdh-III-1	0.210	0.101	0.180
Gdh-III-2	0.445	0.899	0.820
Gdh-III-3	0.345	0.000	0.000
N	155	69	89

- Glutamato Oxalacetato Transaminasa (GOT)

El análisis de este sistema isoenzimático fue realizado en plántulas de 10 días de iniciada la germinación. La determinación del estadio exacto en el que fueron llevados a cabo los ensayos se vió dificultada por la interrupción del crecimiento en gran parte de los individuos.

Se diferenciaron cinco zonas de actividad, cada una de ellas correspondiente a un locus, denominados en orden decreciente desde el extremo anódico: Got-I, Got-II, Got-III, Got-IV y Got-V . En semillas remojadas durante 48 a 72 horas, el único locus que presentó actividad fue Got-III. En las poblaciones de *L. nitida*, las frecuencias alélicas correspondientes a Got-IV no pudieron ser registradas debido a la actividad casi nula de este locus en el estadio analizado.

Estudios previos realizados en la Sección Bifolium (Cortés y Hunziker, 1997) y otras poblaciones de *L. nitida* (Cortés, 1987) indican que la enzima funcional estaría compuesta por dos subunidades proteicas. Los patrones electroforéticos encontrados apoyan la estructura propuesta.

La multiplicidad isoenzimática observada en este sistema fue hallada también en las restantes especies del género (Cortés y Hunziker, 1997), en el género *Bulnesia* (Comas y Hunziker, 1996) y en gran cantidad de géneros vegetales (Gottlieb, 1982).

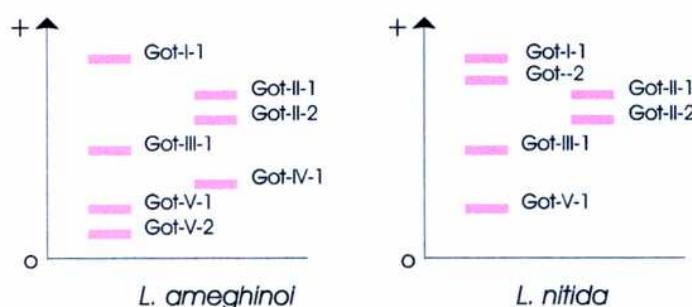


Fig. 16. Got. Representación esquemática de las variantes electroforéticas
Punto de origen (o) - Anodo (+)

En todos los individuos pertenecientes a la población de *L. ameghinoi*, el locus Got-I presentó una sola banda correspondiente al genotipo homocigota para la variante alélica denominada Got-I-1.

En las poblaciones de *L. nitida*, el fenotipo electroforético de los individuos analizados consistió en una banda como mínimo, y tres como máximo. De acuerdo con estas observaciones el locus Got-I poseería dos alelos codominantes: Got-I-1, compartido con la población de *L. ameghinoi*, y Got-I-2, de menor movilidad electroforética y mayor frecuencia. La proporción de individuos heterocigotas para este locus fue muy baja.

Las tres poblaciones incluidas en este estudio presentaron para el gen Got-II dos alternativas alélicas: Got-II-1 y Got-II-2, pudiendo observarse los tres fenotipos esperados para un locus bialélico. La variante de mayor movilidad, Got-II-1, fue la menos frecuente en LN1 y LN2, siendo de frecuencia extremadamente baja en la población de *L. ameghinoi*, LA1.

El locus Got-III fue monomórfico para el mismo alelo (Got-III-) en las tres poblaciones. La interacción no alélica entre los productos codificados por los loci Got-II y Got-III dio lugar a la formación reiterada de una interbanda de movilidad electroforética intermedia (Fig.15).

En relación al locus Got-IV, la ausencia de actividad enzimática para este locus durante el estadio analizado no permitió registrar datos de frecuencia para las poblaciones de *L. nitida*. Sin embargo, pudo observarse actividad en esta zona al modificar el tiempo de germinación. La totalidad de los individuos provenientes de LA1 exhibieron una única banda denominada Got-IV-1.

Los fenotipos electroforéticos observados en la población de *L. ameghinoi*, sugieren que el locus Got-V estaría codificado por un gen con dos variantes alélicas: Got-V-1 y Got-V-2, siendo la primera de ellas la más frecuente. Según esta interpretación, todos los individuos de las poblaciones de *L. nitida* serían homocigotas para la alternativa de mayor movilidad.

En las poblaciones de *L. nitida* analizadas por Cortés (1987) sólo fueron considerados los *loci* Got-I, Got-II y Got-III. Ninguno de los *loci* descriptos para la Sección Larrea podría ser homologado con los loci del mismo nombre hallados en la Sección Bifolium (Cortés y Hunziker, 1997).

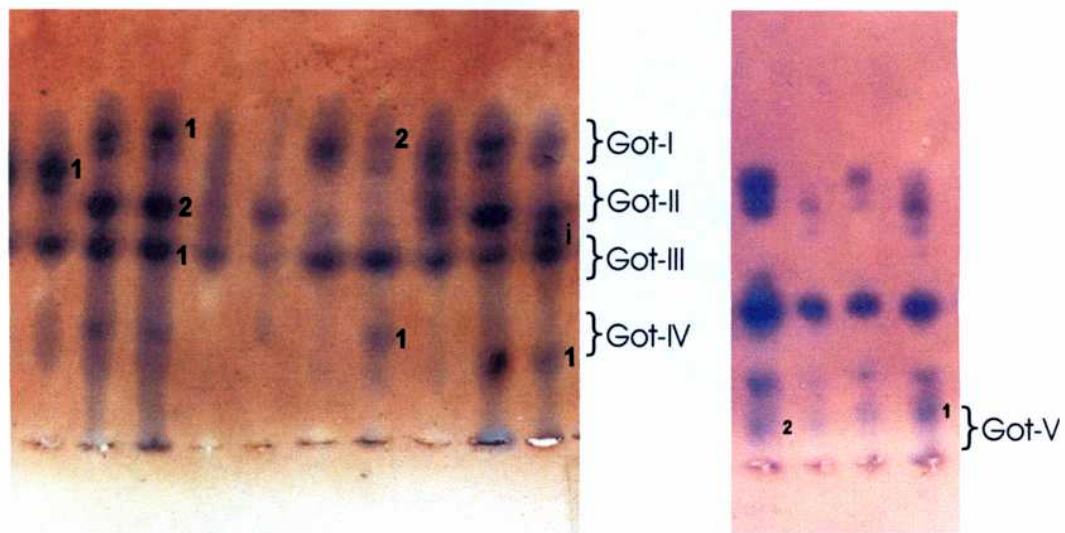


Fig 17. Zimogramas correspondientes al sistema Got

Tabla 7. Frecuencias alélicas para el sistema Got

	Población		
	LA1	LN1	LN2
Got-I-1	1.000	0.196	0.364
Got-I-2	-	0.804	0.636
N	131	46	33
Got-II-1	0.082	0.305	0.198
Got-II-2	0.908	0.695	0.802
N	141	59	43
Got-III-1	1.000	1.000	1.000
N	226	79	46
Got-IV-1	1.000	-	-
N	110	-	-
Got-V-1	0.639	1.000	1.000
Got-V-2	0.341	-	-
N	85	46	35

- Isocitrato deshidrogenasa (Idh)

El análisis de este sistema isonenzimático fue realizado en semillas de 48 horas de iniciada la germinación.

Tres zonas de actividad enzimática pudieron ser diferenciadas: Idh-1, Idh-2, correspondientes a los loci Idh-I e Idh-2, y una tercera zona, Idh-3, cuya interpretación no fue llevada a cabo debido a la escasa resolución.

Los patrones electroforéticos observados para Idh-3 coinciden con la estructura dimérica propuesta para esta enzima (Pasteur, 1984).

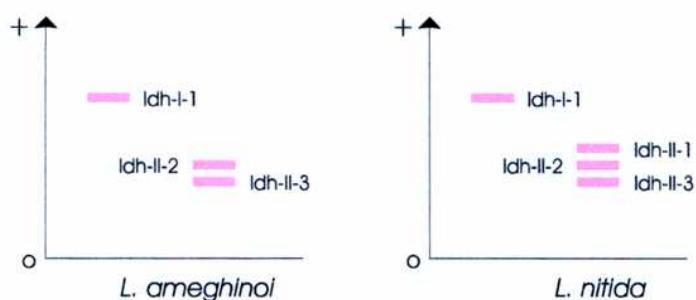


Fig. 18. Idh: Representación esquemática de las variantes electroforéticas
Punto de origen (o) - Anodo (+)

El locus denominado Idh-I presentó una única variante alélica fija en las tres poblaciones analizadas. No obstante, el estadio de mayor actividad fue diferente para ambas especies (semillas remojadas durante 48 hs para *L. ameghinoi* y durante 72 hs. para *L. nitida*)

El análisis de los zimogramas sugiere que Idh-II estaría codificada por un gen con tres alelos codominantes denominados en orden decreciente según su movilidad electroforética: Idh-II-1, Idh-II-2 e Idh-II-3.

Los individuos provenientes de la población LA1 presentaron tres de los seis fenotipos esperados para organismos diploides según la interpretación propuesta. Éstos corresponderían a la condición homocigota y heterocigota para las variantes Idh-II-2 e Idh-II-3.

En las poblaciones de *L. nitida*, las tres alternativas alélicas pudieron ser observadas, así como también los seis posibles fenotipos propuestos.

El alelo más frecuente en las tres poblaciones analizadas fue Idh-II-2.

La ausencia de datos correspondientes a las especies de la Sección Bifolium impide realizar comparaciones en este sistema.

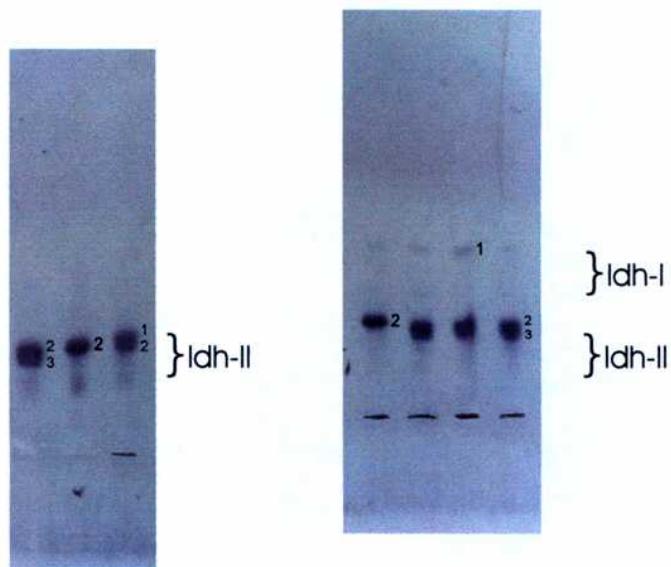


Fig 19. Zimogramas correspondientes al sistema Idh

Tabla 8. Frecuencias alélicas para el sistema Idh

	Población		
	LA1	LN1	LN2
Idh-I-1	1.000	1.000	1.000
N	87	44	35
Idh-II-1	0.000	0.177	0.087
Idh-II-2	0.804	0.735	0.693
Idh-II-3	0.196	0.088	0.220
N	112	113	127

- Malato deshidrogenasa (Mdh)

Para el análisis de las diferentes poblaciones se utilizaron semillas remojadas de 48 horas de iniciada la germinación.

Se detectaron siete zonas de actividad enzimática, cada una de las cuales fue interpretada como un único locus. Los *loci* fueron designados: Mdh-I, Mdh-II, Mdh-III, Mdh-IV, Mdh-V, Mdh-VI y Mdh-VII según orden decreciente de velocidad de migración anódica.

El análisis de los zimogramas obtenidos en el presente estudio sugiere que la enzima funcional estaría compuesta por dos subunidades proteicas. Dichos resultados concuerdan con estudios previos realizados en el género *Bulnesia* (Zygophyllaceae) (Comas y Hunziker, 1996) y con la estructura dimérica propuesta para malato deshidrogenasa en diversos géneros vegetales (Gottlieb, 1982).

Por otro lado, la existencia de un elevado número de isoenzimas para este sistema ha sido documentada asimismo para géneros tales como *Pinus*, *Aster* y *Clarkia* (Gottlieb, 1982).

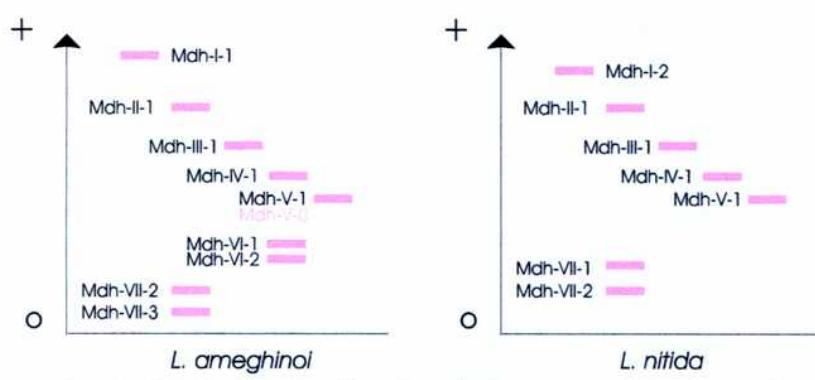


Fig. 20. Mdh: Representación esquemática de las variantes electroforéticas

Punto de origen (o) - Anodo (+)

El locus Mdh-I fue monomórfico en las tres poblaciones estudiadas. Los individuos pertenecientes a la población LA1 presentaron una única banda correspondiente al alelo denominado Mdh-I-1, en tanto que los individuos provenientes de LN1 y LN2 exhibieron una variante de menor movilidad electroforética llamada Mdh-I-2. De este modo, la fijación de alternativas alélicas distintas en las dos especies incluidas en este estudio convierte a Mdh-I en un locus diagnóstico dentro de la Sección Larrea.

Todos los individuos analizados, independientemente de su procedencia, presentaron una única banda de igual velocidad de migración para los *loci* Mdh-II, Mdh-III, y Mdh-IV.

Los fenotipos electroforéticos observados sugieren que el locus Mdh-V estaría codificado por un gen con un alelo no funcional o nulo, Mdh-V-0, y un alelo funcional, Mdh-V-1. Según la interpretación propuesta, los individuos homocigotas para la variante nula no presentarían actividad alguna en este locus. En los heterocigotas, la enzima formada como consecuencia de las interacciones alélicas tampoco sería activa, y, por lo tanto, los patrones electroforéticos de estos individuos resultarían indistinguibles de los hallados en los homocigotas para la alternativa funcional.

Ambas variantes fueron encontradas en la población LA1, mientras que en las poblaciones de *L. nitida* sólo estuvo presente Mdh-V-1.

Las frecuencias alélicas para la población de *L. ameghinoi* fueron calculadas bajo el supuesto de equilibrio de Hardy Weinberg debido a la imposibilidad de utilizar el método de conteo directo.

El análisis del locus Mdh-VI no pudo ser llevado a cabo en las poblaciones de *L. nitida* por no lograrse resolución suficiente. Las frecuencias correspondientes sólo fueron computadas para la población LA1, en donde se encontraron los tres fenotipos esperados para un gen con dos variantes alélicas que fueron denominadas Mdh-VI-1 y Mdh-VI-2.

El locus Mdh-VII estaría codificado por un gen con tres alternativas aléicas codominantes. La variante de movilidad intermedia Mdh-VII-2 resultó ser la más frecuente en las tres poblaciones estudiadas. El alelo Mdh-VII-1 sólo fue hallado en LN1 y en LN2, mientras que Mdh-VII-3 fue observado únicamente en LA1.

Las interacciones no aléicas entre los productos codificados por los diferentes *loci* tuvieron como consecuencia la formación de numerosas interbandas.

El sistema Malato deshidrogenasa no fue estudiado previamente para las especies de la Sección *Bifolium*, razón por la cual, las comparaciones estuvieron restringidas a la Sección *Larrea*.

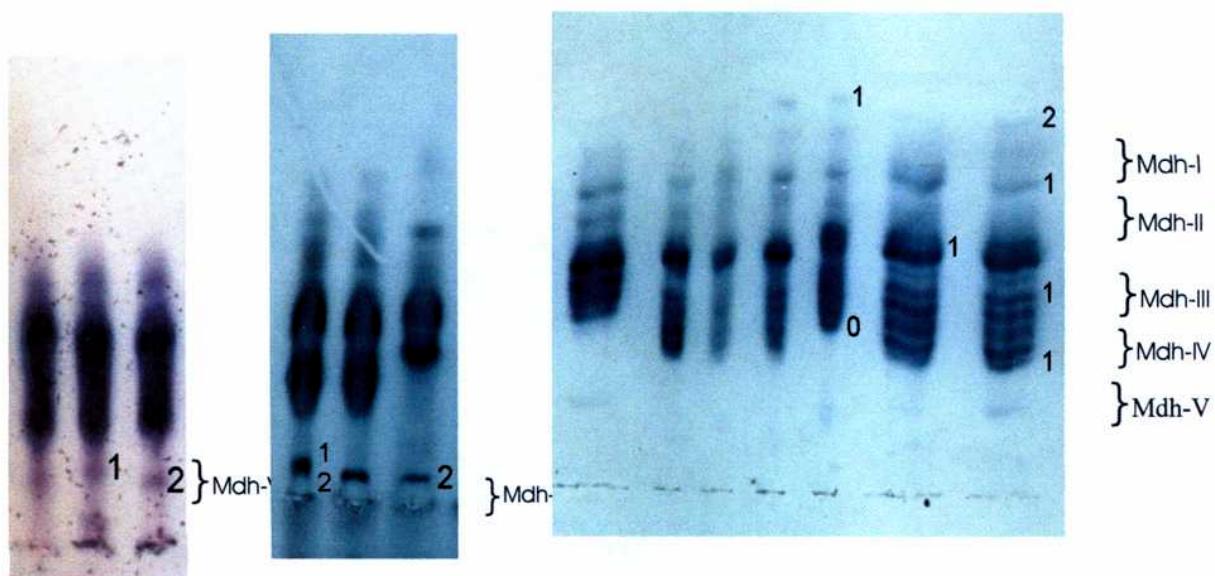


Fig 21. Zimogramas correspondientes al sistema Mdh

Tabla 9. Frecuencias alélicas para el sistema Mdh

	Población		
	LA1	LN1	LN2
Mdh-I-1	1.000	-	-
Mdh-I-2	-	1.000	1.000
N	63	67	73
Mdh-II-1	1.000	1.000	1.000
N	203	78	89
Mdh-III-1	1.000	1.000	1.000
N	226	78	89
Mdh-IV-1	1.000	1.000	1.000
N	148	78	89
Mdh-V-0	0.367	-	-
Mdh-V-1	0.633	1.000	1.000
N	132	78	89
Mdh-VI-1	0.470	-	-
Mdh-VI-2	0.530	-	-
N	-	-	-
Mdh-VII-1	0.000	0.754	0.883
Mdh-VII-2	0.675	0.246	0.117
Mdh-VII-3	0.325	0.000	0.000
N	58	63	77

- Acido Shikímico deshidrogenasa (Skd)

El análisis del sistema shikímico deshidrogenasa fue realizado en semillas remojadas de 36 horas de iniciadas la germinación.

Dos zonas de actividad enzimática pudieron ser diferenciadas en todos los individuos analizados. Cada una de ellas fue interpretada como un locus a los que se dio el nombre de Skd-I y Skd-II.

Los patrones electroforéticos obtenidos para ambos *loci* sugieren que la enzima estaría conformada por una única subunidad proteica. Esta estructura también ha sido propuesta en especies del género *Prosopis* (Verga, 1995; Bessega, 1997).

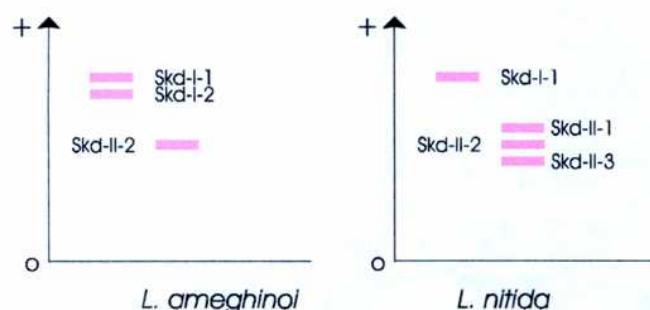


Fig. 22. Skd: Representación esquemática de las variantes electroforéticas
Punto de origen (o) - Anodo (+)

Todos los individuos analizados presentaron una banda como mínimo, y dos como máximo, tanto en Skd-I como en Skd-II.

El locus Skd-I fue interpretado como un gen con dos variantes alélicas codominantes denominadas Skd-I-1 y Skd-I-2. Los tres posibles fenotipos fueron encontrados en los individuos provenientes de LA1, mientras que en las poblaciones LN1 y LN2 la única alternativa hallada fue Skd-I-1.

La existencia de tres alelos para el locus Skd-II (Skd-II-1, Skd-II-2 y Skd-II-3) fue deducida en base a los zimogramas obtenidos. Los individuos provenientes de las

poblaciones de *L. nitida* presentaron fenotipos de una y dos bandas correspondientes a la condición homocigota y heterocigota para las tres alternativas.

En la población de *L. ameghinoi*, Skd-II fue monomórfico, encontrándose fijo el alelo Skd-II-2. Ésta variante resultó ser la más frecuente en LN1 y LN2.

El sistema Skd no fue estudiado en la Sección Bifolium, motivo por el cual no pudieron establecerse comparaciones.

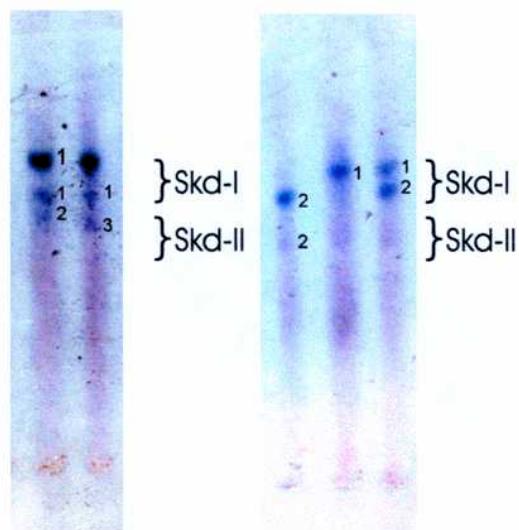


Fig 23. Zimogramas correspondientes al sistema Skd

Tabla 10. Frecuencias alélicas para el sistema Skd

	Población		
	LA1	LN1	LN2
Skd-I-1	0.358	1.000	1.000
Skd-I-2	0.642	-	-
N	120	76	98
Skd-II-1	-	0.078	0.055
Skd-II-2	1.000	0.813	0.849
Skd-II-3	-	0.109	0.096
N	80	64	73

- Superóxido Dismutasa (Sod)

El sistema superóxido dismutasa fue analizado utilizando semillas remojadas de 72 horas de iniciada la germinación.

El análisis de los zimogramas obtenidos permitió identificar varias zonas de actividad Sod, de las cuales sólo cuatro fueron consideradas en el presente análisis. Cada una de ellas estaría codificada por un único locus: Sod-I, Sod-III, Sod - IV y Sod-V. A fin de mantener las designaciones propuestas por Cortés (1987) para la Sección Larrea, la numeración de los loci no se ajusta al criterio de velocidad de migración anódica (Fig. 24)

La uniformidad de los patrones electroforéticos observados no permite hacer inferencias acerca del número de polipéptidos que conforman la enzima funcional en las especies analizadas. Estudios previos realizados en el género *Bulnesia* (Comas y Hunziker, 1996) sugieren que se trataría de una enzima con estructura monomérica, aunque también se ha propuesto una estructura dimérica para esta enzima en diversos organismos (Pasteur, 1988).

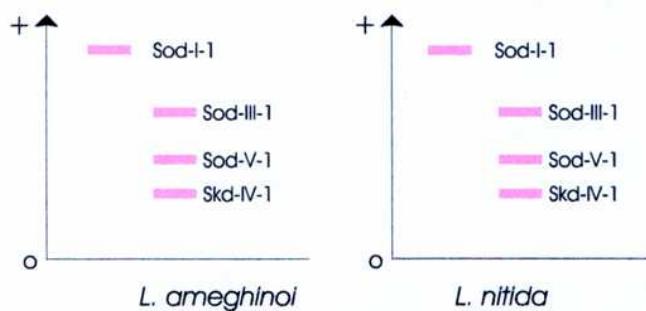


Fig. 24. Sod: Representación esquemática de las variantes electroforéticas
Punto de origen (o) - Anodo (+)

Los cuatro *loci* incluidos en el análisis fueron monomórficos para la misma variante alélica en las tres poblaciones estudiadas. Los productos codificados por dichos genes fueron denominados: Sod-I-1, Sod-III-1, Sod-IV-1 y Sod-V-1. Los resultados obtenidos coinciden con lo hallado por Cortés (1987) en poblaciones de *L. nitida* provenientes de Salta, Mendoza, Neuquén y Chubut, con excepción del locus Sod-V que no fuera incluido en sus estudios.

Los loci Sod-I y Sod-III resultaron homólogos a los genes del mismo nombre descriptos para la Sección Bifolium, en donde fueron monomórficos para iguales alternativas alélicas a las halladas en la Sección Larrea.

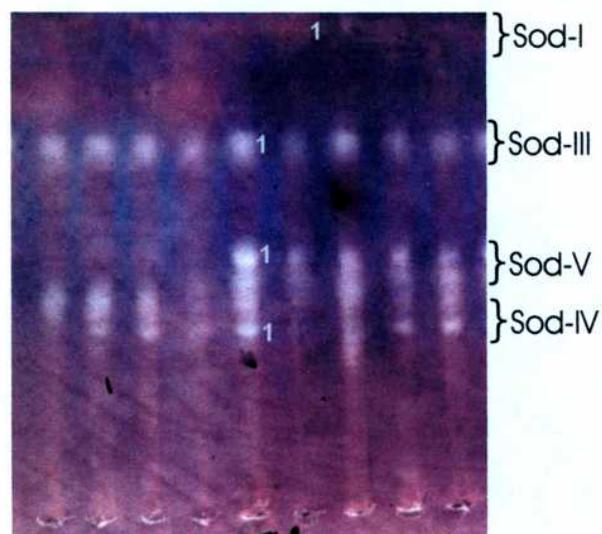


Fig 25. Zimograma correspondiente al sistema Sod

Tabla 11. Frecuencias alélicas para el sistema Sod

	Población		
	LA1	LN1	LN2
Sod-I-1	1.000	1.000	1.000
N	68	52	69
Sod-III-1	1.000	1.000	1.000
N	99	67	96
Sod-IV-1	1.000	1.000	1.000
N	59	51	80
Sod-V-1	1.000	1.000	1.000
N	80	66	81

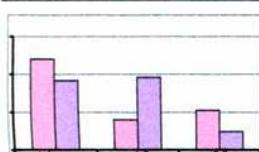
II. Análisis Estadístico

II.a. Ajuste a las proporciones de Hardy – Weinberg

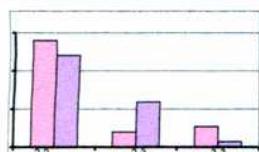
En las tablas a continuación se detallan las frecuencias genotípicas observadas y esperadas, su representación gráfica y los valores de significación de la prueba de Ji-Cuadrado (p) para las tres poblaciones analizadas.

Tabla 12. Frecuencias genotípicas observadas y esperadas en LA1

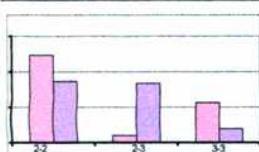
	1-1	1-2	2-2	2-3	3-3	1-3	$p \leq$
6-Pgdh-I							
F. obs.	-	-	31	21	49	-	
F.esp.	-	-	16.93	49.14	34.93	-	0.000
Amp-I							
F. obs.	17	22	20	-	-	-	
F.esp.	13.16	29.68	16.16	-	-	-	0.045*
Amp-III							
F. obs.	6	12	8	1	4	7	
F.esp.	6.2	11.99	5.41	6.19	1.6	6.61	0.027*
Est-II							
F. obs.	2	5	79	-	-	-	
F.esp.	0.21	8.58	77.21	-	-	-	0.000
Gdh-III							
F. obs.	15	20	43	32	30	15	
F.esp.	6.73	29.03	30.59	47.79	18.35	22.51	0.000
Got-II							
F. obs.	11	1	129	-	-	-	
F.esp.	0.90	21.20	118.90	-	-	-	0.000

Got-V

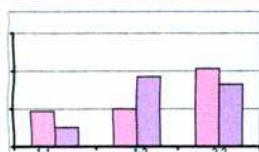
F. obs.	48	16	21	-	-	-	
F.esp.	36.78	38.44	9.78	-	-	-	0.000

Idh-II

F. obs.	-	-	84	12	16	-	
F.esp.	-	-	72.24	35.52	4.24	-	0.000

Mdh-VII

F. obs.	-	-	37	3	17	-	
F.esp.	-	-	25.89	25.21	5.89	-	0.000

Skd-I

F. obs.	28	30	62	-	-	-	
F.esp.	15.29	55.41	49.29	-	-	-	0.000

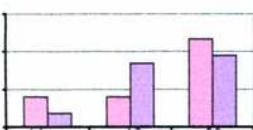
p < 0.000 altamente significativo

*Valores de P entre 0,01 y 0,05 fueron considerados marginalmente significativos

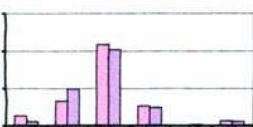
Tabla 13. Frecuencias genotípicas esperadas y observadas en LN1.

	1-1	1-2	2-2	2-3	3-3	1-3	p<
Est-II							
	F. obs.	31	19	21	-	-	-
	F.esp.	22.98	35.04	12.98	-	-	-
							0.000
Gdh-III							
	F. obs.	1	12	56			
	F.esp.	0.66	12.67	55.66			
							0.649
Got-I							
	F. obs.	9	0	37	-	-	-
	F.esp.	1,68	14,64	29,68	-	-	-
							0.000

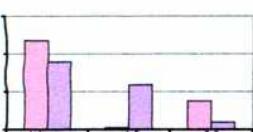
Got-II

	F. obs.	12	12	35	-	-	-	
	F.esp.	5,39	25,23	28,39	-	-	-	0.000

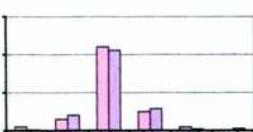
Idh-II

	F. obs.	8	20	65	16	0	4	
	F.esp.	3,47	29,51	60,87	14,76	0.84	3,56	0.016*

Mdh-VII

	F. obs.	47	1	15	-	-	-	
	F.esp.	35,72	23,56	3,72	-	-	-	0.000

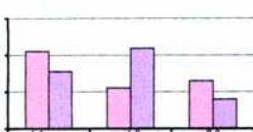
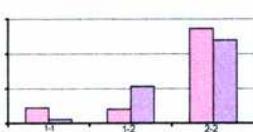
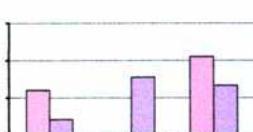
Skd-II

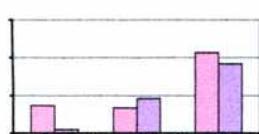
	F. obs.	2	6	44	10	2	0	
	F.esp.	0.35	8.19	42.17	11.47	0,72	1,10	0.008

p < 0.000 altamente significativo

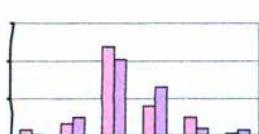
*Valores de P entre 0,01 y 0,05 fueron considerados marginalmente significativos

Tabla 14. Frecuencias genotípicas esperadas y observadas en LN2.

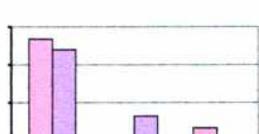
	1-1	1-2	2-2	2-3	3-3	1-3	p<	
Est-II								
	F. obs.	42	22	26	-	-	-	
	F.esp.	31,09	43,82	15,089	-	-	-	0.000
Gdh-III								
	F. obs.	11	10	68	-	-	-	
	F.esp.	2,802	26,40	59,80	-	-	-	0.000
Got-I								
	F. obs.	12	0	21	-	-	-	
	F.esp.	4,25	15,51	13,25	-	-	-	0.000

Got-II

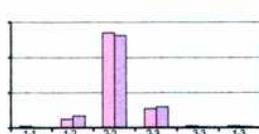
F. obs.	11	10	32	-	-	-	-
F.esp.	1,60	13,80	27,60	-	-	-	0.000

Idh-II

F. obs.	5	10	71	24	15	2	
F.esp.	0.91	15,30	60,87	38,96	6,09	4,87	0.000

Mdh-VII

F. obs.	67	2	8	-	-	-	-
F.esp.	60,00	16,00	1,00	-	-	-	0.000

Skd-II

F. obs.	1	5	54	11	1	1	
F.esp.	0.19	6,84	52,59	11,97	0.63	0.77	0.234

p < 0.000 altamente significativo

El valor de p representa la probabilidad de rechazar una hipótesis nula cierta (Error de tipo I). En este caso, la hipótesis nula plantea que las diferencias entre las proporciones esperadas y observadas son despreciables, en consecuencia, valores de p inferiores a 0,01 indican que las frecuencias observadas en la muestra son significativamente diferentes a las de una población hipotética en equilibrio.

En la población de *L. ameghinoi* la totalidad de los loci presentó desviaciones respecto de lo esperado según el equilibrio de Hardy-Weinberg, considerando los casos alta y marginalmente significativos.

Tanto en LN1 como en LN2 se observó una alta proporción de loci en los que las frecuencias genotípicas no se ajustaron a las proporciones del equilibrio así como también una marcada tendencia hacia el exceso de homocigotas. Estas observaciones concuerdan con los resultados obtenidos por Cortés (1987) para poblaciones de *L. nitida* provenientes de Neuquén, Mendoza y

Chubut, a pesar de que el número de *loci* considerados para estas últimas fue menor. De manera similar a lo observado para Gdh-III en LN1, todas las poblaciones previamente estudiadas se ajustaron a las frecuencias genotípicas esperadas en condiciones de equilibrio.

El análisis de las frecuencias genotípicas en poblaciones de *L. tridentata* y *L. divaricata* (Sección Bifolium) reveló, asimismo, reiteradas desviaciones de las proporciones esperadas según Hardy-Weinberg. Sin embargo, a pesar de que las mismas estuvieron principalmente determinadas por el exceso de homocigotas, el número de heterocigotas para los *loci* Got-II y Gdh-III fue superior a lo esperado en cinco de las nueve poblaciones diploides analizadas. Las restantes poblaciones exhibieron un exceso de homocigotas para el *locus* Got-II, mientras que se ajustaron a las frecuencias de equilibrio para el *locus* Gdh-III (Cortés, 1987).

II.b. Variabilidad genética

En la siguiente tabla se presentan las estimaciones del porcentaje de *loci* polimórficos (P), heterocigosis media esperada por locus (H_e), número efectivo de alelos (n_e) y número medio de alelos por locus (A). Cada uno de los parámetros fue calculado a nivel poblacional, a nivel de la población promedio, indicado por el subíndice p, y a nivel específico, indicado por el subíndice s, cuando ésto fue posible.

Tabla 15. Parámetros de variabilidad genética. Datos de la autora (LA1, LN1, LN2), Cortés (1987) y Cortés y Hunizker (1997)

Especie	Población	P	H _e	H _{obs}	n _e	A	Loci
<i>L. ameghinoi</i>	LA1	39.29 ± 9.23	0.167 ± 0.045	0.068 ± 0.026	1.2	1.46	28
<i>L. nitida</i>							
	LN1	26.92 ± 8.70	0.098 ± 0.034	0.049 ± 0.020	1.11	1.35	26
	LN2	26.92 ± 8.70	0.097 ± 0.034	0.039 ± 0.017	1.11	1.35	26
<i>L. nitida</i>							
	Salta	P _p : 21.67 ± 12.80 P _s : 33.33 ± 12.17	H _{ep} : 0.086 ± 0.052 H _{es} : 0.119 ± 0.046	H _{op} : 0.058 ± 0.042	n _{ep} : 1.10 n _{es} : 1.14	A _p : 1.25 A _s : 1.4	
	Tunuyán	26.67 ± 11.42	0.092 ± 0.043	0.071 ± 0.035	1.10	1.31	15
	Las Heras	26.67 ± 11.42	0.120 ± 0.054	0.062 ± 0.033	1.14	1.31	15
	Chubut	33.33 ± 12.17	0.132 ± 0.051	0.099 ± 0.043	1.15	1.38	15
<i>L. divaricata</i>							
	Santiago	P _p : 54.38 ± 2.55 P _s : 58.8 ± 11.94	H _{ep} : 0.269 ± 0.009 H _{es} : 0.282 ± 0.71	-	n _{ep} : 1.35 n _{es} : 1.39	A _p : 2.25 A _s : 2.60	
	Mendoza	58.80 ± 11.94	0.271 ± 0.068	-	1.38	2.30	17
	La Pampa	52.90 ± 12.10	0.277 ± 0.071	-	1.37	2.20	17
	Río Negro	52.90 ± 12.10	0.253 ± 0.066	-	1.38	2.50	17
<i>L. tridentata</i>							
	Cverde, AZ	P _p : 45.10 ± 5.52 P _s : 52.90 ± 12.10	H _{ep} : 0.211 ± 0.028 H _{es} : 0.225 ± 0.057	-	n _{ep} : 1.25 n _{es} : 1.29	A _p : 2.02 A _s : 2.40	
	Mview.AZ	41.20 ± 11.93	0.201 ± 0.064	-	1.25	2.0	17
	Pecos River NewMex	52.90 ± 12.10	0.250 ± 0.058	-	1.33	2.2	17

II.c. Estructura poblacional

La estructura poblacional se estudió mediante los índices F de Wright (1978). Utilizando los datos de frecuencias génicas y genotípicas tomados de Cortés (1987), dichos estadísticos pudieron ser calculados tanto para las especies de la sección Larrea como para las especies diploides de *Bifolium*, en donde éste análisis no había sido realizado previamente.

Los valores de F_{IS} fueron en su mayoría positivos y altamente significativos, indicando que el exceso de homocigotas es un fenómeno frecuente en las poblaciones analizadas, independientemente de la especie a la que pertenezcan. Los resultados obtenidos confirman las tendencias sugeridas por la prueba de ajuste a Hardy-Weinberg.

El grado de diferenciación entre poblaciones coespecíficas, entre poblaciones de diferentes especies y entre especies pertenecientes a la misma sección se estimó a través del estadístico F_{ST} . A partir de estos datos se calculó el flujo génico (Nm) según la fórmula detallada en la sección de Análisis Estadístico de los Materiales y Métodos. La categoría “totales” (Tablas 16, 17 a y b) corresponde a las estimaciones realizadas considerando el conjunto de las poblaciones analizadas. Valores de flujo superiores a 1 migrante por generación indican que se trataría de poblaciones coespecíficas, cuando esa cifra asciende a más de cinco migrantes por generación, las poblaciones constituirían una unidad panmictica. Los resultados serán comentados en la sección Discusión.

Tabla 16. Índices F_{IS} en poblaciones de *L. nitida* y *L. ameghinoi*. Datos de la autora (LA1, LN1, LN2) y de Cortés (1987). Valores de 11 loci polimórficos.

	LA1	LN1	LN2	LN Salta	LN Las Heras	LN Tunuyan	LN Chubut
Got-I	---	1.000***	1.000***	---	0.337***	0.408***	0.082
Got-II	0.953***	0.520***	0.633***	---	---	---	0.069 ^{NS}
Got-V	0.581***	---	---	---	---	---	---
Amp-I	0.252*	---	---	---	0.377**	0.665***	0.588***
Amp-III	0.182 ^{NS}	---	---	---	0.808***	0.291***	0.704***
Gdh-III	0.323***	0.046 ^{NS}	0.619***	---	0.072 ^{NS}	0.011 ^{NS}	-0.169 ^{NS}
Mdh-VII	0.880***	0.957***	0.874***	---	---	---	---

Idh-II	0.661***	0.160*	0.389***	---	---	---	---
Skd-II	0.456***	0.223*	0.126 ^{NS}	---	---	---	---
6-Pgdh-I	0.571***	---	---	---	---	---	---
Est-II	0.414***	0.454***	0.495***	---	---	---	---
Promedio	0.605	0.480	0.591		0.399	0.344	0.255

* 0,01 < p < 0,05, ** 0,001 < p < 0,01, *** p < 0,001

Tablas 17 a) y b). Índices F_{ST} y Flujo génico (Nm) para pares de poblaciones e índices F_{ST} totales. Datos de la autora (LA1,LN1, LN2) y de Cortés (1987).

a) Estimaciones realizadas a partir de 13 loci

	LA1- LN1	LA1-LN2	LN1-LN2
Got-I	0.7526***	0.5830***	0.0352*
Got-II	0.0826***	0.0249**	0.0146 ^{NS}
Got-V	0.1539***	0.1312***	---
Adh-I	1.000***	1.000***	---
Gdh-1	1.000***	1.000***	---
Gdh-3	0.1258***	0.1053***	0.0121 ^{NS}
Mdh-5	0.1775***	0.1896***	---
Mdh-7	0.3468***	0.4896***	0.0286**
Idh-2	0.0314***	0.0127***	0.0151***
Skd-1	0.4098***	0.4460***	---
Skd-2	0.0842***	0.0641***	0.0018 ^{NS}
6-Pgdh-1	0.3529***	0.3506***	---
Est-II	0.3252***	0.3270***	0.0003 ^{NS}
Promedio	0.3917	0.3959	0.0150
Nm	0.3882	0.3815	16.4167

* 0,01 < p < 0,05, ** 0,001 < p < 0,01, *** p < 0,001

Fst Total: 0.4293

b) Estimaciones realizadas a partir de 9 loci

	LA1- LN Salta	LA1- LN Las Heras	LA1 – LN Tunuyán	LA1- LN Chubut
Got-I	1.000***	0.5240***	0.6807***	0.2059***
Got-II	0.0355***	0.0440***	0.0412***	0.1949***
Adh-I	1.000***	1.000***	1.000***	1.000***
Amp-I	0.6527***	0.1801***	0.3097***	0.2612***
Amp-III	0.3770***	0.0230***	0.1331***	0.0818***
Est-II	0.0251**	0.0251**	0.0251**	0.0251**
6-Pgdh-I	0.3793***	0.3793***	0.3793***	0.3793***
Gdh-I	1.000***	1.000***	1.000***	1.000***
Gdh-III	0.2308***	0.0377***	0.0279***	0.1130***
Promedio	0.6300	0.3843	0.4612	0.3902
Nm	0.1468	0.4005	0.2920	0.3907

b)Continuación

	LN Salta-LN Las Heras	LN Salta-LN Tunuyán	LN Salta – LN Chubut	LN Las Heras- LN Tunuyán	LN Las Heras- LN Chubut	LN Tunuyán- LN Chubut
Got-I	0.1430***	0.0915***	0.3768***	0.0152**	0.1071***	0.1880***
Got-II	---	---	0.2607***		0.3106***	0.2942***
Adh-I	---	---	---	---	---	---
Amp-I	0.4004***	0.1539***	0.1941***	0.0739***	0.0411***	0.0049 ^{NS}
Amp-III	0.3400***	0.0723***	0.1241***	0.1327***	0.0707***	0.0117*
Est-II	---	---	---	---	---	---
6-Pgdh-I	---	---	---	---	---	---
Gdh-I	---	---	---	---	---	---
Gdh-III	0.2460***	0.2844***	0.0991***	0.0083 ^{NS}	0.0352***	0.0779***
Promedio	0.2904	0.1837	0.2423	0.0575	0.1074	0.1208
Nm	0.6108	1.1109	0.7818	4.0978	2.0777	1.8195

* 0,01 < p < 0,05, ** 0,001 < p < 0,01, *** p < 0,001

Fst Total: 0.4969

Tabla 18. Índices F_{IS} en poblaciones diploides de *L. tridentata* y *L. divaricata* calculados a partir de datos de Cortés y Hunziker (1997). Valores de 9 loci polimórficos.

	LD Santiago	LD Tunuyán	LD La Pampa	LD Río Negro	LT Camp Verde	LT Mountain View	LT New Mexico
Got-I	-0.009	0.134	0.098	0.307***	0.279***	0.888***	0.145**
Got-III	-0.088	0.104	-0.021	0.104*	---	---	-0.031
Adh-I	0.305***	0.461***	0.434***	0.453***	0.806***	---	0.528***
Amp-I	0.398***	0.704***	0.550***	0.660***	0.612***	0.968***	0.811***
Amp-III	0.491***	0.478***	0.355***	0.540***	0.490***	0.179**	0.271***
Est-II	0.006	0.004	0.032	-0.007	-0.004	0.040	0.040
Est-III	0.888***	0.464***	0.207*	0.583***	0.818***	0.771***	0.333***
Gdh-I	0.611***	0.914***	0.947***	1.000***	---	---	0.780***
Gdh-III	-0.289*	-0.355**	-0.896***	-1.000***	---	-0.911***	-0.025
Promedio	0.257	0.323	0.190	0.293	0.419	0.323	0.317

* 0,01 < p < 0,05, ** 0,001 < p < 0,01, *** p < 0,001

Tabla 19. Índices F_{ST} y Flujo génico (Nm) en la Sección Bifolium calculados en base a datos de Cortés y Hunziker (1997). Estimaciones realizadas a partir de 10 loci.

	Total	<i>L. divaricata</i> (4 poblaciones)	<i>L. tridentata</i> (3 poblaciones)
Got-I	0.093***	0.029***	0.023***
Got-II	0.097***	0.040***	0.091***
Got-III	0.027***	0.005***	0.018***
Adh-I	0.165***	0.037***	0.071***
Amp-I	0.101***	0.017***	0.022***
Amp-III	0.036***	0.048***	0.008***
Est-II	0.028***	0.024***	0.012***
Est-III	0.028***	0.043***	0.007 ^{NS}
Gdh-I	0.236***	0.172***	0.210***
Gdh-III	0.107***	0.008**	0.204***
Promedio	0.095	0.045	0.062
Nm	2.3815	5,3055	3,7822

II.d. Diferenciación Genética

El grado de diferenciación genética se estudió mediante los índices de identidad genética y de distancia de Nei (1978).

Las estimaciones se realizaron únicamente para las poblaciones de *L. ameghinoi* y *L. nitida*. Las restantes especies del género no pudieron ser incluidas en el análisis dado que el número de loci homologables entre ambas secciones resultó demasiado pequeño sin llegar a conformar una muestra representativa de los loci isoenzimáticos. La distorsión de las matrices de distancia por efecto de la reducción del número de loci se evaluó mediante una prueba t de Student para muestras con heterogeneidad de varianzas. Las diferencias entre los valores de distancia obtenidos al utilizar todos los loci analizados y aquellos hallados al considerar sólo los loci homologables entre las dos secciones del género resultaron altamente significativas. Asimismo, la relación de *L. ameghinoi* (LA1) con las poblaciones de *L. nitida* previamente estudiadas por Cortés (1987) se analizó en forma separada de las poblaciones provenientes de los alrededores de San Antonio Oeste (LN1 y LN2) con el objeto de evitar un número excesivo de datos ausentes debido a las diferencias en el número de loci analizados.

En la tabla 20 figuran los resultados obtenidos para las poblaciones LA1, LN1 y LN2 considerando las frecuencias alélicas correspondientes a 26 *loci* (6-Pgdh, Adh-I, Est-I, Est-II, Est-III, Gdh-I, Gdh-III, Got-I, Got-II, Got-III, Got-V, Idh-I, Idh-II, Mdh-I, Mdh-II, Mdh-III, Mdh-IV, Mdh-V, Mdh-VII, Me-I, Skd-I, Skd-II, Sod-I, Sod-III, Sod-IV, Sod-V). Los valores de identidad y distancia genética presentados en la tabla 21 se calcularon a partir de 14 *loci* isoenzimáticos (6-Pgdh, Adh-I, Amp-I, Amp-III, Est-II, Est-III, Gdh-I, Gdh-III, Got-I, Got-II, Got-III, Sod-I, Sod-III, Sod-IV).

Tabla 20. Identidad genética de Nei (1978) sobre la diagonal - Distancia genética de Nei (1978) debajo de la diagonal (26 *loci*)

	LA1	LN1	LN2
LA1		0.800	0.806
LN1	0.224		0.998
LN2	0.215	0.002	

Tabla 21. Identidad genética de Nei (1978) sobre la diagonal - Distancia genética de Nei (1978) debajo de la diagonal (14 *loci*)

	LA1	LN Salta	LN Las Heras	LN Tunuyán	LN Chubut
LA1		0.634	0.733	0.701	0.723
LN Salta	0.456		0.944	0.974	0.938
LN Las Heras	0.310	0.057		0.984	0.960
LN Tunuyán	0.355	0.026	0.016		0.959
LN Chubut	0.325	0.064	0.041	0.042	

*Datos de la autora (LA1) y Cortés(1987)

II.d. Análisis de agrupamiento

A partir de los datos presentados en las tablas 16 (Figura 26) y 17 (Figura 27) se construyeron dos fenogramas mediante el método de agrupamiento de medias no ponderadas (UPGMA).

En ambos casos se observa la agrupación de las poblaciones coespecíficas.

Figura 26. Análisis de agrupamiento utilizando los coeficientes de Identidad genética de Nei (1978) presentados en la tabla 20.

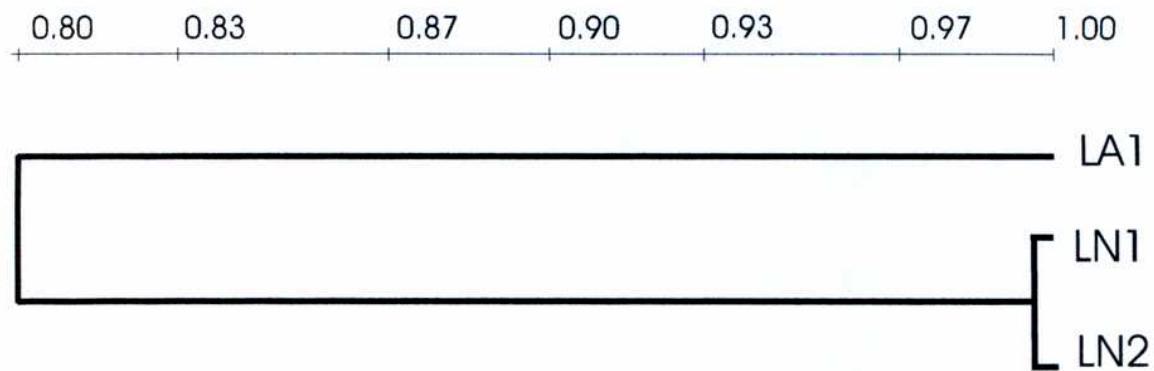
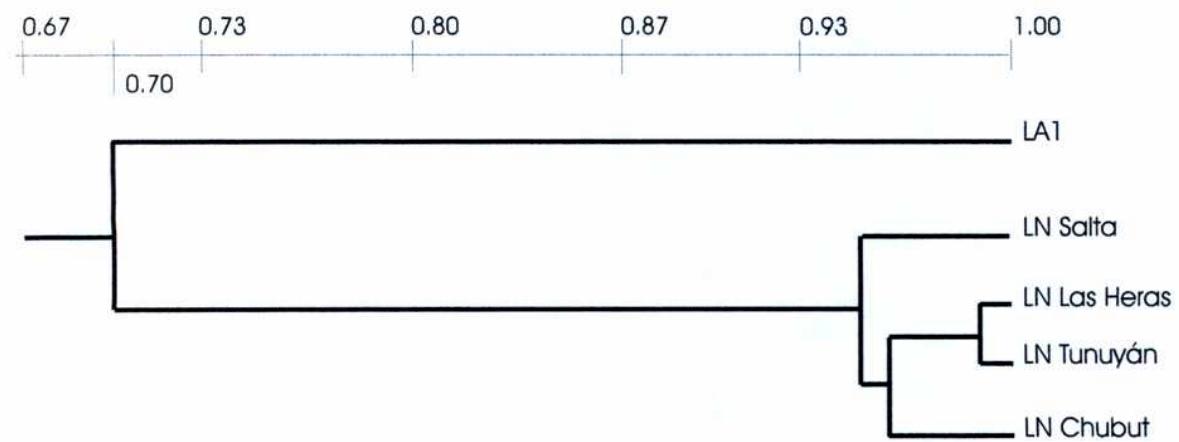


Figura 27. Análisis de agrupamiento utilizando los coeficientes de Identidad genética de Nei (1978) presentados en la tabla 21.



DISCUSSION

DISCUSIÓN

A lo largo de los años diferentes interrogantes han marcado el curso de las investigaciones en genética evolutiva. El estudio de los niveles de variación genética en poblaciones naturales llevó a concluir que la existencia de polimorfismo constituye un fenómeno ampliamente distribuido en toda clase de organismos. Establecido este punto, las preguntas relacionadas con el significado evolutivo de esta variación, las fuerzas involucradas en la conservación de dichos polimorfismos, el patrón de distribución de los mismos, así como la relación existente entre los niveles de variación y las características de cada especie, siguen siendo motivo de estudio.

El advenimiento de técnicas bioquímicas y moleculares ha permitido abordar estos temas a través de diferentes enfoques. En particular, como se mencionara en la introducción, evidencias obtenidas a partir de la electroforesis de isoenzimas han sido útiles en la formulación de hipótesis acerca de los mecanismos de especiación que han intervenido en el surgimiento de ciertas especies. Diversos resultados han sido interpretados como casos de especiación primaria (Soltis 1985, Crawford 1985, Warwick y Gottlieb 1985), especiación híbrida (Gallez y Gottlieb 1982), y especiación por poliploidización, incluyendo tanto aloploidía (Roose y Gottlieb 1976, Gastony 1986, Bayer y Crawford 1986) como autopoliploidía (Epes y Soltis 1984, Lumaret 1986, Wolf *et al* 1987, Soltis y Soltis 1988).

En algunas ocasiones, las similitudes morfológicas y el escaso desarrollo de mecanismos de aislamiento reproductivo evidenciado por la ocurrencia de hibridación natural, han generado complicaciones en lo concerniente a la delimitación de las especies. La utilización de datos isoenzimáticos para la resolución de tales cuestiones no ha sido frecuente, sin embargo, los casos documentados en la bibliografía dan cuenta de la importancia y utilidad de estos marcadores como indicadores taxonómicos (Crawford y Wilson 1979, Crawford 1979, Gottlieb 1982).

La relación entre aislamiento geográfico y grado de divergencia genética también ha sido evaluada mediante la técnica de electroforesis de isoenzimas. Los taxones con distribución disyunta constituyen un caso extremo de aislamiento geográfico. Los estudios moleculares proveen una medida más precisa de la divergencia genética que los caracteres morfológicos

lo cual justifica su inclusión en la caracterización de este tipo de taxones (Crawford and Lee 1992; Crawford *et al* 1992).

El patrón de distribución disyunta que caracteriza al género *Larrea*, así como la existencia de especies con diferentes niveles de ploidía dentro del mismo, al igual que la ocurrencia de hibridación natural entre los representantes sudamericanos y las indefiniciones acerca del status taxonómico de algunos de sus integrantes, convierten al género en un objeto de estudio especialmente interesante para la aplicación de técnicas isoenzimáticas.

Estudios isoenzimáticos previos en el género *Larrea* (Cortés 1987, Cortés y Hunziker 1997) debieron ser limitados a cuatro de las cinco especies que lo componen a causa de la dificultad en la colección de frutos de *L. ameghinoi*. El presente trabajo describe la variabilidad isoenzimática de la única población natural de *L. ameghinoi* cuyos frutos pudieron ser coleccionados hasta la fecha, completando de este modo la caracterización isoenzimática del género *Larrea*.

La representatividad de una única población en relación a la especie puede estar sujeta a cuestionamientos y constituye, sin duda, un factor limitante. Sin embargo, el relevamiento de los resultados de estudios isoenzimáticos publicados entre los años 1968 y 1988, indica que la mayor parte de la variabilidad genética (78%) presente en los *loci* polimórficos se encuentra dentro de las poblaciones, mientras que las diferencias entre poblaciones explicarían una proporción mucho menor de la variabilidad (Hamrick y Godt 1990). Resultados más recientes concuerdan con estas observaciones (Ohara *et al* 1996, Hawley y DeHaves 1994, Kudoh y Whigham 1997, Broyles *et al* 1994).

La existencia de variantes alélicas alternativas fijadas para un mismo locus (locus diagnóstico) evidencia el grado de diferenciación entre poblaciones y puede ser útil para la identificación bioquímica de diferentes especies. Tres *loci* con tales características (Adh-I, Gdh-I, y Mdh-I) fueron hallados al comparar la población de *L. ameghinoi* con dos poblaciones de *L. nitida*, una de ellas en simpatría con la primera. Este hecho es especialmente importante si se considera que la ocurrencia de hibridación e introgresión

entre dichas especies es un fenómeno frecuente en la Patagonia Argentina. El seguimiento de estos marcadores en individuos de difícil identificación podría contribuir con la caracterización y determinación de las preferencias ecológicas de híbridos e introgresantes. El análisis de estos sistemas en los individuos propuestos como *L. simulans* constituye una poderosa herramienta para confirmar el origen híbrido de los mismos.

La identificación basada en marcadores isoenzimáticos ha demostrado ser efectiva en poblaciones simpátricas de *Pinus taeda* y *Pinus echinata*) (Edwards-Burke *et al* 1997).

La morfología floral de *L. nitida* y *L. ameghinoi*, tamaño reducido de las flores y agrupamiento de las anteras alrededor del estilo durante el proceso de formación de las mismas, llevó a sugerir que estas especies serían más propensas a la autofecundación que las especies de la sección Bifolium (Simpson *et al* 1977). No obstante, la existencia de híbridos naturales indica que los eventos de polinización cruzada no deben ser totalmente descartados (Hunziker *et al* 1969). Los resultados del presente estudio avalan estas conclusiones a través de diferentes evidencias.

En la población de *L. ameghinoi*, las diferencias entre las frecuencias genotípicas observadas y las esperadas según el equilibrio de Hardy-Weinberg fueron altamente significativas para todos los *loci* con excepción de Amp-I y Amp-III (Tabla 12). A diferencia de lo que ocurre como producto de un proceso selectivo, o de apareamiento preferencial, la consecuencia de un sistema de apareamiento endogámico es un exceso de homocigotas en todos los *loci*. La prueba de ajuste a H.W. revela un exceso significativo de homocigotas, sin embargo, no permite explicar si éste está siendo ocasionado por desviaciones de la panmixia o si se trata de una consecuencia de la subestructuración (Wahlund 1928). En ausencia de otros procesos el índice de fijación F (Wright 1951) es semejante al coeficiente de endogamia F_{IS} (Wright, 1969), considerando los altos valores de F_{IS} obtenidos para estos mismos *loci* y su significación (Tabla 16), el exceso de homocigotas podría ser adjudicado a un sistema de apareamiento endogámico, y no a la subestructuración de la población.

De acuerdo con lo propuesto por Nei (1987), “la neutralidad de la mayoría de los alelos presentes en los *loci* polimórficos parece cumplirse como regla general, sin embargo, existen polimorfismos que, definitivamente, están relacionados con presiones de selección.”

En este contexto, la discrepancias entre la distribución de frecuencias genotípicas del *locus* Amp-III y la distribución observada en los restantes *loci* polimórficos podría ser explicada por la existencia de presiones de selección, ya sea para este locus o para algún otro locus ligado al mismo.

En las poblaciones de *L. nitida*, LN1 y LN2, la mayor parte de los *loci* presenta un exceso de homocigotas (Tabla 13 y 14). Los índices de fijación indican, asimismo, desviaciones respecto de la unión al azar de gametas. Nuevamente, un reducido número de *loci* en donde se alcanzan las proporciones del equilibrio podría ser un indicio de la existencia de selección.

Al comparar las poblaciones *L. nitida* provenientes de Río Negro con las de Mendoza, Tunuyán y Chubut (Cortés, 1987) la tendencia observada es la misma. Al analizar las poblaciones pertenecientes a las especies de la otra sección (Cortés, 1987, Cortés y Hunziker, 1997) la heterogeneidad en relación al ajuste al equilibrio de H.W es mayor, sin poder distinguirse un patrón fijo.

De particular interés es el *locus* Gdh-III, en cinco de las seis poblaciones de *L. nitida* comparadas, las frecuencias genotípicas se ajustaron a las proporciones del equilibrio, a pesar de que los restantes loci exhibieron un exceso de homocigotas, en tanto que en todas las poblaciones de *L. tridentata* y *L. divaricata*, donde la autofecundación es menos frecuente, presentó un exceso de heterocigotas (Cortés, 1987). Este comportamiento podría ser indicador de una presión de selección cuyo efecto es ejercido sobre las especies arbustivas diploides del género, independientemente del grado de especialización y preferencias ecológicas de cada una.

La variabilidad genética fue analizada principalmente a través de dos parámetros: P (porcentaje de loci polimórficos) y H_e (heterocigosis media esperada por locus). La alta correlación entre P y H_e , observada al analizar los resultados obtenidos en más de 40 especies de dicotiledóneas, indica que ambas estimaciones describen la diversidad genética (Nevo *et al.*, 1984). A pesar de ello, la arbitrariedad en la designación del criterio de polimorfismo, junto con una mayor distorsión como consecuencia de un número reducido de individuos o *loci* en el estadístico P, convierte a H en una medida más apropiada ya que no depende de una definición arbitraria y puede ser calculada inequívocamente en términos

de las frecuencias génicas (Nei, 1987). El valor de H representa la proporción promedio de heterocigotas por locus en una población con apareamiento al azar, y es igual a la proporción de loci heterocigotas en un individuo (Nei, 1987). Cuando las poblaciones se alejan del equilibrio, como sucede en gran parte de las aquí analizadas, H representa la probabilidad de que dos genes elegidos al azar en una población sean diferentes.

A pesar de presentar medias diferentes, las diferencias entre los valores de H_e obtenidos para la población de *L. ameghinoi* ($H_e=0.167\pm 0.045$) y las poblaciones de *L. nitida*, provenientes de Río Negro ($H_e=0.098\pm 0.034$), fueron no significativas (Tabla 15). El mismo resultado se obtuvo al analizar las poblaciones de *L. nitida* de Mendoza, Tunuyán y Chubut (Cortés, 1987). En contraposición a esto último, al comparar dichos datos con los correspondientes a los de la población promedio de cada especie de la Sección Bifolium (Cortés y Hunziker, 1997) las diferencias halladas fueron significativas.

La heterocigosis observada (H_{obs}) en la población de *L. ameghinoi* (0.068 ± 0.026) y en las poblaciones de *L. nitida* procedentes de Río Negro (0.049 ± 0.020 ; 0.039 ± 0.017) estuvieron en el rango de los documentados por Nevo *et al* (1984) para dicotiledóneas (0.052 ± 0.049).

Las estimaciones de diversidad genética promediando todas las poblaciones (P_p , H_{ep}) resultaron tan altas como las correspondientes a los valores específicos (P_s , H_{es}) confirmando que en *L. nitida*, *L. divaricata* y *L. tridentata* la mayor parte de la diversidad genética puede hallarse dentro de las poblaciones.

El sistema reproductivo es un factor determinante de la variabilidad genética de las poblaciones vegetales; así, poblaciones de especies de autofecundación tienden a presentar menor diversidad que aquellas de fecundación cruzada, o con sistemas mixtos (Hamrick y Godt 1990).

La menor diversidad genética observada para las especies de la Sección Larrea junto con el marcado exceso de homocigotas en las poblaciones de dichas especies, concuerdan con los mayores niveles de autofecundación sugeridos por la morfología floral para esta Sección.

El movimiento de polen y semillas influencia la estructura genética de las poblaciones de plantas y determina la independencia de las mismas como unidades evolutivas (Levin and

Kerster 1974, Slatkin 1987, 1994, Heywood 1991). La ocurrencia restringida de flujo génico permite la diversificación de las poblaciones en respuesta a las presiones de selección locales o por efecto de la deriva, mientras que el flujo a través de largas distancias promueve la homogeneización (Slatkin 1985, Ellstrand 1992).

La diferenciación entre las poblaciones fue evaluada promediando los índices F_{ST} de Wright (1978) para todos los *loci*. Los valores hallados para cada locus no fueron los mismos en todos los casos presentando una marcada variación. En teoría estos resultados podrían ser cuestionables ya que si los alelos en estudio son selectivamente neutros, entonces las estimaciones de flujo génico en cada locus deben concordar. Sin embargo, la selección, la historia de la población, las diferencias en las tasas de mutación entre *loci*, y la variación aleatoria del flujo génico pueden aumentar la variación cuando se estiman los F (Slatkin y Barton 1989, Barton y Clark 1990).

La diferenciación entre la población de *L. ameghinoi* y las poblaciones de *L. nitida* provenientes de Río Negro, tanto en simpatría como en alopatía, y las provenientes de Mendoza, Tunuyán, Salta y Chubut (Cortés, 1987) resultó mayor (F_{ST} : 0.3843-0.6300) a la observada para poblaciones coespecíficas (F_{ST} : .0150-0.2904). (Tabla 17ayb).

Los resultados indican que el flujo génico entre ambas especies está muy restringido, o bien es inexistente, ya que en todas las comparaciones de a pares, aún en condiciones de simpatría, las cifras fueron inferiores a un migrante por generación, mientras que entre poblaciones de *L. nitida* geográficamente aisladas el flujo osciló entre 0.6108 y 4,0978 migrantes por generación..

Por otro lado, la homogeneidad de frecuencias entre las poblaciones de *L. nitida* provenientes de Rio Negro junto con el elevado flujo génico estimado, indican que ambas poblaciones estarían comportándose como una unidad panmíctica. Este hecho puede resultar discordante con el aislamiento esperado entre poblaciones de especies con altos niveles de autofecundación distanciadas más de 50 km. Sin embargo, la homogeneidad de frecuencias puede estar reflejando una reciente separación entre ambas poblaciones y no el intercambio real de genes.

El tipo de sistema reproductivo ejerce, asimismo, gran influencia en la diferenciación genética entre poblaciones, en general, las poblaciones de especies de autofecundación

presentan mayor grado de diferenciación, en tanto que en las que son mixtas los valores son más bajos siendo aún menores en las especies de fecundación cruzada. El tipo de reproducción parece tener mayor efecto en la diferenciación que el modo de dispersión de la semilla. (Loveless y Hamrick 1984, Hamrick y Godt 1990). Por ende, una mayor diferenciación entre las poblaciones de *L. nitida* con respecto de lo que ocurre en *L. tridentata* y *L. divaricata*, en donde la diferenciación es similar, concuerda con un mayor porcentaje de autofecundación en la primera, y una mayor tendencia hacia la fecundación cruzada en las últimas.

Los valores de F_{ST} hallados al considerar conjuntamente poblaciones de *L. tridentata* y *L. divaricata* son altamente significativos, pero expresan una reducida diferenciación. El aislamiento geográfico entre ambos taxones hace improbable que la escasa diferenciación sea producto del intercambio génico y estaría indicando una separación relativamente reciente de estas especies o pocos cambios después de la separación.

A diferencia de lo observado para *L. nitida*, en *L. divaricata* valores de flujo génico superiores a cinco migrantes por generación están acompañados de diferencias altamente significativas en las frecuencias alélicas de los *loci* polimórficos, por lo tanto no podría decirse que se trata de una unidad panmíctica. Los procesos involucrados en la conservación de la diferenciación a pesar del elevado flujo génico no pueden ser inferidos a partir de éste análisis.

La asignación de un grupo a determinada categoría taxonómica se basa, generalmente en observaciones morfológicas y fisiológicas, así como en el grado de aislamiento reproductivo respecto de grupos similares. En la práctica, el reconocimiento de estas diferencias puede no ser tan sencillo. En tales situaciones, la información provista por las distancias genéticas puede resultar sumamente útil ya que éstas constituyen una medida del número de sustituciones nucleotídicas por sitio, o visto de otro modo, de las sustituciones génicas por locus, entre dos pares de especies o poblaciones (Nei, 1987).

El análisis isoenzimático ha permitido la delimitación de especies y subespecies en varios grupos vegetales (Burdon et al 1980; Panetta y Carstairs 1989; Moran y Marshall 1978).

Las poblaciones pertenecientes a especies cogénericas son en promedio mucho menos similares que las poblaciones pertenecientes a la misma especie (Gottlieb 1981, Crawford

1983, Giannasi y Crawford 1986). Además, las distancias genéticas entre especies son en general mayores que las existentes entre subespecies (Nei, 1987). Thorpe (1982) estudió la distribución de índices de similitud o identidad (I) para poblaciones coespecíficas, especies cogenéricas y géneros de la misma familia. De acuerdo con sus conclusiones, es poco probable que poblaciones alopátricas de status dudoso que presenten identidades por debajo de 0.85 pertenezcan a la misma especie, mientras que especies nominales cuyos valores ascienden a más de 0.85 deben ser consideradas dudosas en ausencia de otro tipo de evidencias.

Como se mencionara en la introducción, se ha postulado que *L. ameghinoi* y *L. nitida* podrían considerarse semiespecies parcialmente simpátricas. El establecimiento del grado de divergencia genética entre estas especies a través del estudio de poblaciones simpátricas, en donde existe formación de híbridos e introgresantes, y alopátricas (Cortés, 1987) con el objeto de aportar nuevos elementos de juicio en relación a esta hipótesis, constituye uno de los objetivos del presente trabajo.

La identidad entre la población de *L. ameghinoi* y las poblaciones de *L. nitida* fue máxima en estado de simpatría ($I=0.80$) (Tabla 20) y se redujo para las poblaciones geográficamente más distantes ($I= 0.634 - 0.733$) (Tabla 21). Dado que estos valores fueron calculados a partir de diferentes números de *loci* no es posible establecer relaciones entre distancia genética y distancia geográfica. Sin embargo, a pesar de ser menor el número de *loci*, el hecho de que las poblaciones de *L. nitida* exhiban valores de identidad superiores a 0.94 en cualquiera de las combinaciones de a pares sugiere que los valores obtenidos en relación a *L. ameghinoi* pueden ser considerados indicadores confiables del grado de divergencia genética entre ambas especies.

El alto grado de similitud ($I=0.99$) entre las poblaciones de *L. nitida* provenientes de Río Negro concuerda con los altos valores de flujo génico y la homogeneidad de frecuencias alélicas observada para estas poblaciones confirmando la escasa diferenciación entre ambas.

Los valores de identidad hallados entre *L. ameghinoi* y *L. nitida* no estarían de acuerdo con lo esperado para poblaciones pertenecientes a subespecies diferentes. Si bien se conocen estudios en los cuales subespecies claramente definidas en base a caracteres morfológicos, presentaron valores de identidad inferiores a 0.8, es necesario destacar que en todos estos

casos las poblaciones consideradas se encontraban geográficamente aisladas (Whalen 1979; Crawford y Bayer 1981, Smith y Crawford 1984). Además, en las tres especies del género en donde pudo analizarse más de una población: *L. nitida* (Cortés 1987), *L. divaricata* y *L. tridentata* (Cortés y Hunziker 1997), los valores de identidad de poblaciones coespecíficas fueron siempre superiores a 0.9, confirmando que el comportamiento del género en este sentido coincide con lo observado en otros grupos vegetales (Nei, 1987). Por otro lado, es interesante señalar que la identidad entre las poblaciones de *L. tridentata* y *L. divaricata*, taxones cuyo status taxonómico también ha estado sujeto a controversia, fue en muchos casos superior a 0.9 (Cortés y Hunziker, 1997).

El hecho de que el índice de Identidad entre la población de *L. ameghinoi* y la población de *L. nitida* en simpatría sea de 0.8, sumado a la significativa diferenciación entre ambas según lo indican los F_{ST} de Wright (1978), sugiere que estas poblaciones pertenecen a especies cogenéricas diferentes.

CONCLUSIONES

- La descripción de los patrones de variación en *L. ameghinoi* permite completar la caracterización isoenzimática del género *Larrea*. Los resultados obtenidos concuerdan con la división en secciones propuesta para el mismo.
- El menor grado de diversidad genética, los valores positivos y altamente significativos de los coeficientes de endogamia y la mayor diferenciación entre poblaciones coespecíficas dentro de la sección *Larrea* en comparación con la sección *Bifolium*, concuerdan con los mayores porcentajes de autofecundación sugeridos por la morfología floral.
- Los valores de Identidad hallados entre poblaciones de *L. ameghinoi* y de *L. nitida*, así como el alto grado de diferenciación entre ambas especies, coincide con lo esperado para poblaciones pertenecientes a especies cogenéricas diferentes (Thorpe, 1982).



B I B L I O G R A F

Bibliografía

Axelrod D.I. 1950. Studies in late Tertiary paleobotany. VI. Evolution of desert vegetation in western North America, pag. 215-306. Carnegie Inst. Wash. Pub. 590. 323 pag.

Barbour, M. 1969. Patterns of genetic similarity between *Larrea divaricata* of North and South America. Amer. Midl. Naturalist 81: 54-87.

Bayer, R. J. and D.J. Crawford. 1986. Allozyme divergence among five diploid species of *Antennaria* (Asteraceae: Inuleae) and their allopolyploid derivatives. American Journal of Botany. 73:287-296.

Barton N.H. and A.Clark, 1990. Population structure and processes in evolution. Pp. 115-173 in K Wohrman and S. Jain, eds. Population biology: ecological and evolutionary viewpoints. Springer, New York.

Bessegá C. 1997. Estudios isoenzimáticos en especies americanas del género *Prosopis* (Leguminosae). Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Blackshear P. J. 1984. Systems for polyacrylamids gel electrophoresis. Methods n Enzymol. 104: 237-255.

Broyles S.B., Schnabel A. y R. Wyatt. 1994. Evidence for long-distance pollen dispersal in milkweeds. (*Asclepias exaltata*). Evolution 48(4): 1032-1040.

Burdon J.J., Marshall D.R. and R. H. Groves. 1980. Isozyme variation in *Chondrilla juncea* L. in Australia. Australian Journal of Botany. 28: 193-198.

Campos Lopez E., T. J. Mabry y S. Fernandez Tavizón (red) "Larrea".1979. Evolutionary relationships of the species of *Larrea*. Campos Lopez E., T. J. Mabry y S. Fernandez. Tavizón (red) "Larrea" Serie El Desierto, vol. 2. Centro de Invest.Qca. aplicada. Saltillo, Coahuila, México. 9-15

Cardy B.J., Stuber C.W, Wendel J.F. and M.M. Goodman. 1983. Techniques for starch gel electrophoresis of enzymes from maize (*Zea myas* L.). Inst. Stat. Mimeo. No. 1317R, North Carolina State University, Raleigh.

Chrambach A. and D. Rodbard. 1971. Polyacrylamide gel electrophoresis. Science 172: 440-451.

Comas C. I. and J.H. Hunziker. 1996. Isozyme variation in *Bulnesia retama*, *B. schickendantzii* and *B. foliosa* (Zygophyllaceae). Pl. Syst. Evol. 199:193-202.

Conkle M.T., Hodgskiss P.D., Nunnally L.B. and S.C. Hunter. 1982. Starch gel electrophoresis of conifer seeds: a laboratory manual. General Technical Report PSW-64. U.S.D.A Forest Service Pacific Southwest Forest and Range Experiment Station , Berkeley.

Cortés M.C. 1987. Estudio de la variación alozímica en el género *Larrea*. Tesis Doctoral. Fac. de Cs. Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.

Cortés M.C. and J. H. Hunziker. 1997. Isozymes in *Larrea divaricata* and *Larrea tridentata* (Zygophyllaceae): A study of two amphitropical vicariants and autoploidy. Genetica 101: 115-124.

Cozzo D. 1948. Anatomía del leño secundario de las especies argentinas de la tribu "Zygophylleae" (Zygofiláceas). Rev. Inst. Nac. Investig. Cienc. Nat. Cienc.Bot. 1:57-85.

Crawford, D.J. 1979. Allozyme studies in *Chenopodium incanum*: intraspecific variaton and comparison with *C. fremontii*. Bull. Torrey Bot. Club. 106: 258-266.

Crawford, D.J. 1983. Phylogenetic and systematic inferences from electrophoretic studies. In S. O. Tanksley and T. J. Orton (eds). Isozymes in plant genetics and breeding. Part A. 257-287. Elsevier, Amsterdam.

Crawford, D.J. 1985. Electrophoretic data and plant speciation. Syst. Bot. 10. 405-416.

Crawford, D.J. and H.D. Wilson. 1979. Allozyme variation in several closely related diploid species of *Chenopodium* of the western united States. American Journal of Botany. 66:237-244.

Crawford D.J. and R.J. Bayer. 1981. Allozyme divergence in *Coreopsis ciclocarpa* (Compositae). Syst. Bot. 6:373-379.

Crawford D. J. and N.S. Lee. 1992. Electrophoretic and RAPD divergence between disjunct species and populations of flowering plants in North America and Asia. American Journal of Botany 79: 6-7. (Abstract).

Crawford D. J., Lee N.S and T.F. Stuessy. 1992. Plant species disjunctions: perspectives from molecular data. ALISO 13: 395-409.

Edwards-Burke M., Hamrick J.L. and R.A. Price. 1997. Frequency and direction of hybridization in sympatric populations of *Pinus taeda* and *P. echinata* (Pinaceae). American Journal of Botany. 87: 879-886.

Ellstrand N.C. 1992. Gene flow among seed plant populations. New Forests. 6:241-256.

Epes D.A. y D.E. Soltis. 1984. An eletrophoretic investigation of *Galax urceolata* (Diapensiaceae). American Journal of Botany. (Abstract). 71:165.

Gabriel O. 1971. Locating enzymes on gels. Mehods in Enzymol. 22: 578-604.

Gallez G. P. and L.D. Gottlieb. 1982. Genetic evidence for the hybrid origin of the diploid plant *Stephanomeria diegensis*. Evolution 36: 1158-1167.

Gastony G. J. 1986. Electrophoretic evidence for the origin of fern species by unreduced spores. American Journal of Botany 73: 1563-1569.

Giannasi D.E. and D.J. Crawford. 1986. Biochemical systematics II. A reprise. In M.K. Hecht, B. Wallace and G.T. Prance (eds) Evolutionary Biology Vol. 20, 25-248. Plenum Press. New York.

Gomori G. 1939. Mcrotechnical demonstration of phosphatase in tissue sections Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 42:23.

Gorman G.C. and J.R. Renzi. 1979. Genetic distance and heterozygosity estimates in electrophoretic studies: Effects of sample size. *Copeia* 1979:242-49.

Gottlieb L.D. 1973. Enzyme differentiation and phylogeny in *Clarkia franciscana*, *C. rubicunda* and *C. amoena*. *Evolution* 27:205-214.

Gottlieb L.D. 1977. Electrophoretic evidence and plant systematics. *Ann. Missouri. Bot. Gard.* 64:161-180.

Gottlieb L.D. 1981. Electrophoretic evidence and plant populations. *Prog. Phytochem.* 7:1-46.

Gottlieb L.D. 1982. Conservation and duplication of isozymes in plants. *Science* 216: 373-380.

Grant V. 1971. Plant speciation. Columbia Univ. Press, New York.

Hames B.D. and d. Rickwood (eds.) 1981. Gel electrophoresis of proteins: a practical approach. IRL. Press. Washington. D.C.

Hamrick J.L. 1979. Genetic variation and longevity. En. Solbrig O.T., Jain S., Johnson G. B., and P.H. Raven. Topics in Plant Population Biology. Columbia University Press. New York. Inc.: 85-113.

Hamrick J.L. and J.W. Godt. 1990. Allozyme diversity in plant species. In Brown H.D., Clegg M.T., Kahler A. L. y Weir B.S. (Eds.). Plant Population Genetics, breeding, and genetic resources. Sinauer Associates Inc. Publishers Sunderland, Massachusetts.

Harris B. D. and D. Rickwood (eds). 1977. Handbook of enzyme electrophoresis in human genetics. North Holland. Amsterdam.

Hawley J.G. and DeHaves D. H. 1994. Genetic diversity and population structure of red spruce (*Picea rubens*). Canadian Journal of Botany. 72: 1778-1786.

Heywood J.S. 1991. Spatial analysis of genetic variation in plant populations. Annual Review of Ecology and Systematics 22:335-355.

Hunter L. and C. L. Markert. 1957. Histochemical demonstration of enzymes separated by zone electrophoresis in starch gels. *Science* 125: 1294-1295.

Hunziker J.H. 1975. On the geographical origin of *Larrea divaricata*. (Zygophyllaceae). *Ann. Missouri Bot. Gard.* 62:497-500.

Hunziker J. H., Palacios R. A., Soriano A. 1969. Hibridación natural en especies sudamericanas de *Larrea* (Zygophyllaceae).

Hunziker J. H., Palacios R.A., Valesi A.G. de y L. Poggio. 1972. Evolución en el género Larrea. *Memorias de Simposia. I. Congreso Latinoamericano de Botánica. México.* 365-278.

Hunziker J. H., Palacios R.A., Valesi A.G. de y L. Poggio. 1973. Species disjunctions in Larrea: Evidence from morphology, cytogenetics, phenolic compounds and seed albumins. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 59; 524-233.

Hunziker J.H., R. A. Palacios, L. Poggio, C.A. Naranjo and T.W. Yang. 1977. Geographic distribution, morphology, hibridization, cytogenetics and evolution. En: Mabry T.J., J.H. Hunziker D.R. Difeo (eds). *Creosote bush. Biology and Chemistry of Larrea in New World deserts. US/IBP Synthesis series N.*

Hunziker J. H., Palacios R.A., Valesi A.G. de y L. Poggio. 1978. Hybridization in Larrea (Zygophyllaceae): A morphological, cytogenetic and chemosystematic study. *Bol. Acad. Nac. Ciencias Córdoba. Tomo 52: (3/4):* 281-313.

Hunziker J.H. y B. A. Schaal. 1983. Isozyme variation in diploid tropical and octoploid subtropical-temperate species of *Bulnesia*. *J. Heredity* 74: 358-360.

International Union of Biochemistry Nomenclature Committee. 1984. Enzyme nomenclature 1987. Academic Press. New York.

Johnston I.M. 1940. The floristic significance of shrubs common to North and South American deserts. *Jour. Arnold Arboretum* 21:356-363.

Johnson F.M., Richardson R.H. and M. P. Kambsellis. 1968. Isozyme variability in species of the genus *Drosophila*. III. Qualitative comparison of the esterases of *D. aldrichi* and *D. mulleri*. Biochem. Genet. 1: 239-247.

Karihaloo J.L. and L.D. Gottlieb. 1995. Allozyme variation in eggplant *Solanum melongena* L. (Solanaceae). Theor. Appl. Genet. 90:578-583.

Kimura M. y J.F. Crow. 1964. The number of alleles that can be maintained in a finite population. Genetics 49: 725-738.

Kudoh H. and D.F. Whigham. 1997. Microgeographic genetic structure and gene flow in *Hibiscus moscheutos* (Malvaceae) populations. American Journal of Botany. 84(9):1285-1293.

Le Cam L.M., Neyman j. and E.L. Scott. (eds.) 1972. Darwinian, Neo Darwinian and Non Darwinian Evolution. Proc. Sixth Berkeley Symp.. Math. Stat. Prob., Vol. 5. Univ. California Press. Berkeley.

Leaback D. H. 1976. Concentration gradient polyacrylamide gel electrophoresis. In: I Smith (ed.) chromatographic and electrophoretic techniques. Vol. II. 250-271. Heinemann Medical Books. London.

Levin D.A. and H.W. Kerster. 1974. Gene flow in seed plants. Evolutionary Biology. 7:139-220.

Lewontin R. C. 1979. La base genética de la evolución. Ediciones Omega S.A. Barcelona. 328 págs.

Lewontin R.C. and Hubby J.L. 1966. A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations. II. Amount of variation and degree of heterozygosity in natural populations of *Drosophila pseudoobscura*. Genetics 54: 595-609.

Loveless M.D. and J.L. Hamrick. 1984. Ecological determinants of genetic structure in plant populations. Annual Review of Ecology and Systematics. 13:65-95.

Lumaret, R. 1986. Doubled duplication of the structural gene for cytosolic phosphoglucose isomerase in the *Dactylis glomerata* L. polyploid complex. Mol.Biol.Evol. 3: 499-521.

Mabry T.J., DiFeo D.R., Sakakibara C.F., Bohnstedt C.F. and D. Seigler. 1977. The Natural Products. Chemistry of *Larrea*. In: Mabry T.J, Hunziker J.H. y D.R. Difeo (eds.). Creosote Bush. Biology and Chemistry of *Larrea* in New World Deserts. US/IBP Synthesis Series N°6. Dowden, hutchinson and Ross. Inc.: chapter 6: 115-134.

Mac Donald T. y Brewbaker J.L. 1972. Isoenzyme polymorphism i flowering plants. VIII. Genetic control and dimeric nature of transaminase hybrid maize isoenzymes. J. Herdity 63: 11-14.

Manchenko G.P. 1994. Handbook of Detection of Enzimes on Electrophoretic Gels. CRC Press Inc.

Markert C.L, Müller F. 1959. Multiple forms of enzymes: Tissue, ontogenetic, and species specific patterns. Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 45: 653-63.

Marshall D.R. and A.H. D. Brown. 1975. The charge state model of protein polymorphism in natural populations. J. Mol. Evol. 8: 149-163.

McReynolds, M.S. 1967. Homologous esterases in three species of the *virilis* group of *Drosophila*. Genetics 56: 527-540.

Miyamoto M. M. 1983. Biochemical variation in the frog *Eleutherodactylus bransfordii*: Geographic patterns and cryptic species. Syst.Zool. 31: .43-51.

Monticelli J. V. 1939. El género *Larrea* Cavanilles, su historia y revisión. Physis 15: 331-356.

Moran G.F. and D.R. Marshall. 1978. Allozyme uniformity within and variation between races of the colonizing species *Xanthium strumarium* L. (Noogoora burr). Australian Journal of Botany. 44: 191-199.

Morden C.W., doebley J.F. and K.F. Schertz. 1987. A manual of techniques for starch gel electrophoresis of *Sorghum* isozymes. Texas Agric. Expt. Sta. Misc. Publ. No. 1635. College Station.

- Nei M. 1972. Genetic distance between populations. Am. Nat. 106: 283-292.
- Nei M. 1975. Molecular population genetics and evolution. North-Holland Publ. Co. Amsterdam, Oxford. Amer. Elsevier Publ. Co. Inc. New. York. 288 págs.
- Nei M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. Genetics 89: 583-90.
- Nei, M. 1987. Molecular Evolutionary Genetics. Columbia University Press. New York.
- Nei M., Tajima F. and Y. Tateno. 1983. Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. II. Gene frequency data. J. Mol. Evol. 19: 153-70.
- Nei M. and Chesser R.K. 1983. Estimation of fixation indexes and gene diversities. Ann. Hum. Genet. 47:253-259.
- Nevo E., Beiles A. and R. Ben-Shlomo. 1984. The evolutionary significance of genetic diversity: ecological, demographic and life history correlates. In G.S. Mani (Ed). Evolutionary Dynamics of Genetic Diversity.
- O'Malley D., Wheeler N.C. and R. P. Guries. 1980. A manual for starch gel electrophoresis. Staff Paper Series 11. Dept. Forestry, College of Agric. and Life Sciences. University of Wisconsin, Madison.
- Ohara M., Takeda H., Ohno Y. and Y. Shimamoto. 1996. Variations in the breeding system and the population genetic structure of *Trillium kamtschaticum* (Liliaceae). Heredity 76: 476-484.
- Ohno S. 1970. Evolution by gene duplication. Springer-Verlag. New York. Heidelberg. Berlin.
- Ornstein L. and B.J. Davis. 1959. Disc electrophoresis. Distillation Products Industries. Division of Eastman Kodak Co.
- Ostrowski W. 1983. Electrophoretic examination of enzymes. J. Chromatogr. Libr. 18B: 287-339.

Palacios R.A. y J.H. Hunziker. 1972. Observaciones sobre la taxonomía del género Larrea (Zygophyllaceae). *Darwiniana* 17: 473-476.

Panetta, F.D. and S.A. Carstairs. 1989. Isozymic discrimination of tropical Australian populations of mesquite (*Prosopis* spp.): implications for biological control. *Weed Research*. 29: 157-165.

Pasteur N., Pasteur G., Bonhome F., Catalan J. and M. Cobb. 1988. Practical isozyme Genetics. Ellis Horwood Limited.

Pedrola-Monfort J. y J. Caujapé-Castells. 1996. Genetic and morphological divergence in the *Androcymbium gramineum* complex (Colchicaceae). *Pl. Syst. Evol.* 201:149-162.

Porter D.M. 1974. Disjunct distribution in the New World Zygophyllaceae. *Taxon* 23: 339-346.

Poulik, M.D. 1957. Starch gel electrophoresis in a discontinuous system of buffers. *Nature* 180: 1477-1479.

Prakassh S., Lewontin R. C., Hubby J. L. 1969. A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations. IV. Patterns of genic variation in central, marginal and isolated poplations of *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics* 61: 841-58.

Rasmuson B. and D. Rudin. 1971. Variation in esterase zymogram patterns in needles of *Pinus silvestris* from provenances in Northern Sweden. *Silvae Genet.* 20:39-41.

Raymond S. and L. Weintraub. 1959. Acrilamida gel as suporting medium for zone electrophoresis. *Science* 130: 711.

Rogers J. S. 1972. Measures of genetic similarity and genetic distance. *Univ. Tex. Publ.* 721: 145-35.

Roose, M.L. and L.D. Gottlieb. 1976. Genetic and biochemical consequences of polyploidy in *Tragopogon*. *Evolution* 30: 818-830.

Rudin D. 1977. Leucine-amino-peptidase (LAP) from needles and macrogametophytes of *Pinus sylvestris* L. Inheritance of allozymes. *hereditas* 85:219-226.

Ruiz Leal A. 1970. Rehabilitación de *Larrea simulans* Sandwith (Zygophyllaceae). Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica. 13 (2-3): 182-187..

Sandwith N. Y. 1927. New species from the Andes of Argentina. Bull. of Misc. Int. 1: 174-178. Royal Bot. Gard. Kew.

Saidman B.O and C. A. Naranjo. 1982. Variaciones de esterasas en poblaciones de *Prosopis ruscifolia* (Leguminosae). *Mendeliana* 5:61-70.

Scandalios J.G. 1969. Genetic control of multiple molecular forms of isozymes in plants: a review.

Scandalios J.G. and L.G. Espiritu. 1969. Mutant aminopeptidases of *Pisum sativum*. I. development genetics and chemical characteristics. *Molec. Gen. Genet.* 105:101-102.

Schaal B.A. and W.W. Anderson. 1974. An outline of techniques for starch gel electrophoresis of enzymes from the american oyster *Crassostrea virginica gmelin*. Department of Zoology. Univ. Georgia. Athens.Georgia.

Shaw Ch. R. and R. Prasad. 1970. Starch gel electrophoreis of enzymes- a compilation of recipes. *Biochem. Genet.* 4: 279-320.

Selander R.K., Smith M.H., Yang S., Johnson W.E. and J.S. Gentry. 1971. IV. Biochemical polymorphism and systematics in the genus *Peromyscus*. I. Variation in the old-field mouse (*Peromyscus polionotus*). *Studies in Genetica* IV: 49-90.

Shannon L.M. 1968. Plant isoenzymes. *Ann. Rev. Plant Physiol* 19: 187-210.

Simpson B.B., J.L. Neff and A.R. Moldenke. 1977. Reproductive systems of *Larrea*. In: Mabry T.J, Hunziker J.H. y D.R. Difeo (eds.). *Creosote Bush. Biology and Chemistry of Larrea in New World Deserts*. US/IBP Synthesis Series N. 6, Dowden, Hutchinson and Ross, Inc.: chapter 4: 92-114.

Slatkin M. 1985. Gene flow in natural populations. Annual Review of Ecology and Systematics. 16:393-430.

Slatkin M. 1987. Gene flow and the geographic structure of natural populations. Science 236:787-792.

Slatkin M. 1994. Gene flow and population structure In L. A. Real (ed) Ecological genetics, 3-17. Princeton University Press, Princeton, NJ.

Slatkin M. and N.H. Barton. 1989. A comparison of three indirect methods for estimating average levels of gene flow. Evolution 43:1349-1368.

Smith, E.B. and D. J. Crawford. 1984. Biosystematic study and typification of the Caloifornian *Coreopsis* (Compositae). sections Tuckermannia, Pugipappus, and Euleptosyne. Sida 10: 275-289.

Smith-Cavalli S. 1976. Divergência isozimica e relações evolutivas entre espécies do gênero *Relbunium* (Rubiaceae). Dissertação apresentada ao curso de posgraduação em Genética da Univ. Federal do Rio Grande do Sul para obtenção do grau de Mestre em Genética.

Smithies O. and M.D. Poulik. 1956. Two dimensional electrophoresis of proteins. Nature 177: 1033.

Sneath P.H. A. and Sokal R.R. 1973. Numerical Taxonomy: The principles and practice of numerical classification. Ed. Freeman. San Francisco. 359 págs.

Soltis D.E. 1985. Allozymic differentiation among *Heuchera americana*, *H. parviflora*, *H. pubescens*, and *H. villosa* (Saxifragaceae). Syst. bot. 10: 193-198.

Soltis D.E., Haufler C.H. , Darrow D.C., and G.J.Gastony. 1983. Starch gel electrophoresis of ferns: a compilation of grinding buffers, gel and electrode buffers and staining schedules. Amer. Fern. J. 73: 9-27.

- Soltis, P.S. and D.E. Soltis. 1988. Electrophoretic evidence for genetic diploidy in *Psilotum nudum*. American Journal of Botany. 75:1667-1671.
- Swofford D. L. and Selander R.B. 1981. Biosys-1: a FORTRAN program for the comprehensive analysis of electrophoretic data in population genetics and systematics. The Journal of Heredity, 72: 281-283.
- Thorpe, J. P. 1982. The molecular clock hypothesis: Biochemical evolution, genetic differentiation, and systematics. Ann. Rev. Ecol. Syst. 13:139-68.
- Tigerstedt P.M.A. 1974. Genetic structure of *Picea abies* population as determined by the isozyme approach. Proceeding Soint. IUFRO Meeting, S. 02.04. Stockholm, session b:1-3.
- Tiselius A. 1937. A new apparatus for electrophoretic analysis of colloidal mixtures. Trans. Farady Soc. 33: 524-531.
- Turner B.L. 1972. Chemosystematic data. Their use in the study of disjunctions. Ann. Missouri Bot. Gard. 59:152-164.
- Vallejos E. 1983. Enzyme activity staining. In S.D. Tanksley and tJ. Orton (eds.). isozymes in plant genetics and breeding. Part A. 669-516. Elsevier. Amsterdam.
- Verga A.R. 1995. Genetische Untersuchungen an *Prosopis chilensis* und *Prosopis flexuosa* (Mimosaceae) im trockenen Chaco Argentiniens. Dissertation In Gottingen Research Notes in Forest Genetics. Gottinger fortgenetische Berichte Abteilung Fur Forstgenetik und Forstpflanzenzuchtung der Universitat Gottingen. ISSN 09407103-.
- Wall J.R. y T.W. Whitaker. 1971. Genetic control of leucine-aminopeptidase and esterase isozymes in the interspecific cross *Cucurbita ecuadorensis* x *C. maxima*. Biochem. Genet. 5:223-229.
- Wahlund S. 1928. Zusammensetzung von Populationen und Korrelationsercheinungen vom Standpunkt der Vererbungslehre aus betrachtet. Hereditas 11:65-106.

Warwick, S.I. and L. D. Gottlieb. 1985. Genetic divergence and geographic speciation in *Layla* (Compositae). Evolution 39:1236-1241.

Wells P.V. 1969. Preuves paleontologiques d'une vegetation tardi – Pleistocene (datée per le ^{14}C) dans les anjourd'hui desertiques d'Amerique du Nord. Rev. Géog. Phys. Géol. Dynam. 11: 335-340.

Wells P.V. and R. Berger. 1967. Late Pleistocene history of coniferous woodland in Mojave Desert. Science 155:1640-1647.

Wells P.V. and J.H. Hunziker. 1977. Origin of the creosote bush (*Larrea*) deserts of southwestern North America. Ann. Missouri Bot. Gard. 63: 843-861.

Whalen, M.D. 1979. Allozyme variation and evolution in *Solanum* section Androcerus. Syst. Bot. 4:203-222.

Wolf P.G., P.S. Soltis and D.E. Soltis. 1987. Autopolyploid evolution in *Heuchera grossularifolia* (Saxifragaceae). American Journal of Botany.(Abstract) 74: 767.

Wright S. 1951. The genetical structure of populations. Ann. Eugen. 15:323-54.

Wright S. 1965. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. Evolution 19:395-420.

Wright S. 1969. Evolution and the Genetics of Populations. Vol. 2: The Theory of Gene Frequencies. Chicago: III.: University of Chicago Press.

Wright S. 1978. Evolution and the Genetics of Populations. Vol. 4: Variability Within and Among Natural Populations. Chicago, III.: University of Chicago Press.

Yang T.W. 1967. Ecotypic variation in *Larrea divaricata*. Ann. Jour. Bot. 54:1041-1044.

Yang T.W. 1968. A new chromosome race of *Larrea divaricata* in Arizona Western Reserve.Acad. Nat. Hist. Museum. Spec. Publ. 2:1-4.

Yang, T.W. 1970. Major chromososome races of *Larrea divaricata* in North America. Jour. Arizona Acad Sci. Vol. 6: 41-45.

Yang T.W. and C. H. Lowe. 1968. Chromosome variation in ecotypes of *Larrea divaricata* in the North American Desert. Madroño 19: 161-164.

Yang T.W., J. H. Hunziker, L. Poggio and C.A. Naranjo. 1977. Hybridization between southamerican jarilla and northamerican diploid creosote bush (*Larrea* Cav., Zygophyllaceae). Plant System. and Evol. 126: 331-346.

Zouros E., Tsakas S. and c.B. Frimbas. 1968. The genetics of Dacus oleae. II. The genetics of two adult esterases. Genet. Res. Camb. 12:1-9.

Zouros E., Van Delden W., Odense R. y H. Van Dijk. 1982. An esterase duplication in *Drosophila*. Differences in expression of duplicated *loci* within and among related species. Biochem. Genet. 20: 929-942.

Apéndice de abreviaturas

EDTA	Acido etilén diamino tetra acético
MTT	Bromuro de dimetiltiazol-2-il-difeniltetrazolio
NAD	Nicotinamida adenina dinucleótido (oxidado)
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido (reducido)
NADP	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (oxidado)
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (reducido)
NBT	Azul de nitro tetrazolio
PMS	Metasulfato de fenacina
TEMED	Diamina N,N,N,N'- tetrametileno
NaOH	Hidróxido de Sodio