

Tesis de Posgrado

Cromosomas : Contenidos de ADN y cromatografía de compuestos fenólicos en Bulnesia y géneros afines (Zygophyllaceae)

Poggio, Lidia

1977

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

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría 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 doctoral 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:

Poggio, Lidia. (1977). Cromosomas : Contenidos de ADN y cromatografía de compuestos fenólicos en Bulnesia y géneros afines (Zygophyllaceae). Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1555_Poggio.pdf

Cita tipo Chicago:

Poggio, Lidia. "Cromosomas : Contenidos de ADN y cromatografía de compuestos fenólicos en Bulnesia y géneros afines (Zygophyllaceae)". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1977.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1555_Poggio.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA


Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

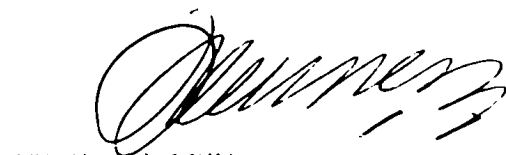
Buenos Aires, 3 de marzo de 1978.

En la fecha, la Sub-Comisión de Doctorado del Departamento de Ciencias Biológicas, presentó dos (2) ejemplares del trabajo final de Tesis de la Licenciada LIDIA - POGGIO.


JUAN N. GALASSO
SECRETARIO GENERAL

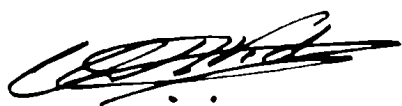
Buenos Aires, 7 de marzo de 1978.

Pase al Jurado designado, a fin de que se sirva considerar el presente trabajo de Tesis.


PATRICIA M. QUIROGA
SECRETARIA GENERAL

En la fecha, el jurado designado procedió a considerar el Trabajo de Tesis de la Licenciada LIDIA POGGIO, resolviendo aceptarlo.







Buenos Aires, 5 de junio de 1978.

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

CROMOSOMAS, CONTENIDO DE ADN Y CROMATOGRFIA
DE COMPUESTOS FENOLICOS EN
BULNESIA Y GENEROS AFINES (Zygophyllaceae)

Lidia Poggio

Tesis para optar al título de Doctora en Biología
Director de tesis: Dr. Juan H. Hunziker

1977

1 5 6 3

C O N T E N I D O

	<u>CONTENIDO</u>	I
	<u>PREFACIO</u>	III
I.-	<u>INTRODUCCION</u>	1
II.-	<u>MATERIALES</u>	7
III.-	<u>CROMOSOMAS</u>	11
III.1.-	<u>Introducción</u>	11
III.2.-	<u>Métodos</u>	15
III.3.-	<u>Resultados</u>	16
IV.-	<u>CROMATOGRAFIA DE COMPUESTOS FENOLICOS</u>	23
IV.1.-	<u>Introducción</u>	23
IV.2.-	<u>Métodos</u>	30
	a) <u>Técnicas utilizadas</u>	30
	b) <u>Resultados y discusión de las técnicas empleadas</u>	35
IV.3.-	<u>Resultados</u>	38
V.-	<u>TALONOMIA NUMERICA EN BULNESIA EN BASE A COMPUESTOS FENOLICOS</u>	60
V.1.-	<u>Introducción</u>	60
V.2.-	<u>Material y Método</u>	62
V.3.-	<u>Coefficientes de similitud</u>	64
V.4.-	<u>Desarrollo manual de los métodos</u>	66
V.5.-	<u>Desarrollo de los métodos mediante computación</u>	84
V.6.-	<u>Resultados</u>	85

VI.-	<u>CITOESPECTROFOTOMETRIA</u>	91
VI.1.-	<u>Introducción</u>	91
VI.2.-	<u>Materiales y Métodos</u>	98
	1) <u>Preparación del material</u>	98
	2) <u>Mediciones microespectrofotométricas</u>	100
VI.3.-	<u>Resultados</u>	101
VII.-	<u>DISCUSION</u>	105
VII.1.-	<u>Estudios citológicos en Bulnesia y géneros afines</u>	105
VII.2.-	<u>Citoespectrofotometría</u>	108
VII.3.-	<u>Cromatografía de compuestos fenólicos en los géneros Bulnesia, Porlieria y Plectrocarpa</u>	112
VII.4.-	<u>Quimiotaxonomía numérica en el género Bulnesia</u>	117
VIII.-	<u>CONCLUSIONES</u>	121
IX.-	<u>RESUMEN</u>	128
X.-	<u>BIBLIOGRAFIA</u>	131

P R E F A C I O

Mi interés en la familia Zygophyllaceae data desde el año 1969 momento en que el Dr. Juan H. Hunziker inicia sus investigaciones en el género Larrea y me ofrece participar en los estudios citológicos del mismo. Posteriormente, inicié como tema de tesis para el doctorado el estudio de los géneros relacionados con Larrea, en especial del género Bulnesia, siendo los resultados obtenidos los presentados en este trabajo.

Agradezco muy especialmente a mi Director de Tesis, el Dr. Juan H. Hunziker, la dirección que en todo momento me ha brindado y la lectura crítica del trabajo que he realizado. La mayoría de las recolecciones de los materiales fueron realizadas por Juan H. Hunziker, C.A. Naranjo y R.A. Palacios, a los cuales quedo muy agradecida, como así también a E. Di Fulvio, P. Goldblatt, R. Rollins, F. Vervoorst y O. Zöllner que me enviaron materiales de otros lugares del país y de otros países.

También deseo agradecer al Dr. O.T. Solbrig por las facilidades ofrecidas en el Gray Herbarium de la Universidad de Harvard, donde realicé gran parte del trabajo de citología y resolví algunos problemas en la técnica de cromatografía; al Dr. Blanco, por las consultas acerca de cromatografía; al Dr. Jorge Crisci por la realización de algunos fenogramas con la computadora de la Universidad Nacional de La Plata y por la revisión y corrección de la sección de quimiotaxonomía numérica; al Dr. C. Conti y a la Dra. I. Gimenez por la guía y enseñanza en el manejo del citoespectrofotómetro de la Comisión Nacional de Energía Atómica; a la Lic.

C. Zaccaro por la enseñanza de algunas técnicas de anatomía de hojas; a la Sra. Elvira de Tenca por el estímulo y la ayuda brindada en la preparación del material de cromatografía; al Lic. E.J. Firpo por la valiosa ayuda en el trabajo de dactilografía y compaginación del manuscrito y, finalmente, deseo expresar mi reconocimiento a mi esposo, Carlos A. Naranjo, por el apoyo moral que siempre me ha brindado.

I.- INTRODUCCION

La familia Zygophyllaceae consta de 26 géneros y aproximadamente 250 especies, siendo muchas de ellas arbustos o subarborescentes y unas pocas árboles o hierbas. La mayoría de las especies se encuentran distribuidas en regiones cálidas y son especialmente abundantes en semidesiertos. Actualmente, la familia se encuentra dividida en siete subfamilias: Augeoideae Engler (Augea Thumb.); Chitonioidae Engler (Morkillia Rose et Painter, Viscainoa Greene); Nitrarioideae Engler (Nitraria L.); Peganoideae Engler (Malacocarpus Fisher et Meyer, Peganum L.); Tetradiclidoidae Engler (Tetradiclis Stev. ex Bieb.); Tribuloideae D.M. Porter (Kallstroemia Scop., Kelleronia Schinz, Tribulopsis R. Br., Tribulus L.); Zygophylloideae (Bulnesia C. Gay, Fagonia L., Guaiacum L., Larrea Cav., Metharme Phil. ex Engler, Miltianthus Bunge, Neoluederitzia Schinz, Pintoa C. Gay, Plectrocarpa Gill., Porlieria Ruiz y Pavon, Seetzenia R. Br., Sericodes Gray, Sisyndite E. Meyer ex Sonder et Harv. et Sonder, Tetraena Maxim. y Zygophyllum L. (Hutchison, 1967; Porter, 1972).

Esta familia se encuentra distribuida en el Nuevo y Viejo Mundo. En el Nuevo Mundo se encuentran Bulnesia, Fagonia, Guaiacum, Kallstroemia, Larrea, Metharme, Morkillia, Peganum, Pintoa, Plectrocarpa, Porlieria, Sericodes, Tribulus, Viscainoa y Zygophyllum. Los géneros Morkillia, Viscainoa y Sericodes son norteamericanos; Metharme, Pintoa y Plectrocarpa sudamericanos, Guaiacum y Kallstroemia se extienden de Norte a Sud América a través de los trópicos. Hay varios géneros disyuntos: entre Norte y Sud América se encuentran Fagonia, Larrea y Porlieria; entre el Nuevo y Viejo Mundo Fagonia y Peganum y entre el Norte y el Sur de Sud América Bulnesia (Porter, 1974).

Sólo se conocían, hasta el presente, recuentos cromosómicos en cinco de ellos (Darlington and Wylie, 1955; Cave 1958-1964; Ornduff, 1967, 1968, 1969; Bolthovskikh et al. 1969; Moore, 1973,

1974; Solbrig and Gadella, 1970). En el género Fagonia se conocen especies con $2n=18,20,22$ ca 24 ($x=9,10,11$ y 12) (Negodi, 1939; Reese, 1957; Porter, 1963, 1967; Baquar et al, 1965; Baquar 1967, 1970. Borgen, 1970; Amin, 1972). En Zygophyllum se conocen especies con $2n=16,18,20,22$ y 44 ($x=8,9,10$ y 11) (Warburg, 1938; Reese, 1957; Miège, 1960; Baquar et al, 1965; Zakharyeva et al, 1968; Baquar, 1969; Borgen, 1969; Astanova, 1970; Eid, 1970; Bhattacharya et al, 1971). En el género Guaiacum sólo se conoce el número cromosómico de G. officinale Linn. $2n=ca 26$ (E.K. Janaki-Ammal, citado por Darlington and Wylie, 1955). Dentro del género Bulnesia sólo se conocía hasta ahora el número cromosómico de B. retama (Gill. ex Hook) Griseb., $2n=26$ (Schnak y Covas, 1947).

En Larrea el número básico es $x=13$ y su citología ha sido ampliamente estudiada (Covas y Schnack, 1946; Covas, 1949; Rahn, 1960; Yang, 1967, 1970; Yang y Lowe, 1968; Hunziker et al, 1969, 1972, 1973, 1977).

El género Larrea constituye un caso muy interesante de distribución disyunta anfitropical, cubriendo regiones semidesérticas en Argentina, Chile, Bolivia, Perú, México y S.W. de Norteamérica. Larrea está compuesto de dos secciones, una con hojas multifolioladas y pétalos pequeños (Sect. Larrea) y otra con hojas bifolioladas y pétalos más grandes (Sect. Bifolium) (Palacios y Hunziker, 1972). La primera de estas secciones agrupa a las especies diploides ($x=13$ $2n=26$) L. nitida que crece en Chile (Coquimbo, Santiago), Oeste y Sur de Argentina (Salta a Chubut) y L. ameghinoi (Patagonia, desde Neuquén a Santa Cruz). La sección Bifolium está constituida por el tetraploide ($2n=52$) L. cuneifolia (Argentina, desde Salta a Chubut) y el complejo L. divaricata. Este último tiene una distribución disyunta con dos taxa por lo menos; estos taxa han sido reconocidos como diferentes especies: L. divaricata Cav. (Sudamérica) y L. tridentata (Sesse et Moc. ex DC.) Cov. (Norteamérica), o como diferentes subespecies de una especie anfitropical: L. divaricata subsp. divaricata y L. divaricata subsp. tridentata (Sesse et Moc.

ex DC.) Feulg. et Lowe. El taxon norteamericano consta de tres citotipos: diploide (Desierto de Chihuahua), tetraploide (Desierto de Sonora) y hexaploide (Desierto de Mohave) (Yang 1967, 1968, 1970; Yang et Lowe, 1968; Barbour, 1969). Yang (1968, 1970) ha sugerido que la raza tetraploide del Desierto de Sonora habría surgido por hibridación entre el diploide del Desierto de Chihuahua y un diploide muy similar al Sudamericano y la subsiguiente poliploidización; el hexaploide del Desierto de Mohave habría derivado por autoploidización de triploides naturales surgidos por hibridación entre los tetraploides del Desierto de Sonora y diploides del Desierto de Chihuahua.

Hunziker et al (1969) han señalado la existencia de hibridación natural entre las cuatro especies sudamericanas. En el Norte de la Patagonia, donde conviven las cuatro especies, se han encontrado 5 híbridos interespecíficos que son intermedios en sus características morfológicas y químicas. La cromatografía de compuestos fenólicos ha sido muy útil en la identificación correcta de los híbridos, ya que éstos presentan adición casi total de los compuestos fenólicos característicos de cada especie. Los estudios citológicos de los híbridos indicaron que L. ameghinoi y L. nitida están estrechamente relacionadas y poseen pocas diferencias en cuanto a la estructura general de sus cromosomas; L. divaricata poseería un genomio en común con L. cuneifolia y, en consecuencia, estaría estrechamente relacionada con uno de sus progenitores ancestrales o habría sido uno de ellos. Los híbridos interseccionales mostraron un alto grado de citomixis lo cual hizo imposible un estudio detallado de la meiosis (Hunziker et al, 1972, 1973, en prensa).

Los estudios de Yang et al (1977) demostraron que los híbridos entre los taxa diploides L. divaricata (Sudamérica) y L. tridentata (Norteamérica) tienen apareamiento normal, lo cual indicaría que los genomios de ambas entidades son homólogos. La elec-

troforesis de proteínas de semillas y la cromatografía de compuestos fenólicos en hojas indicaron que ambas entidades serían muy afines. Con respecto a las características morfológicas los híbridos resultaron intermedios. Estos dos taxones constituirían un caso límite entre especie y subespecie y podrían ser considerados como semiespecies alopátricas.

Con respecto al origen geográfico de Larrea se han esbozado varias hipótesis. Se presentaron evidencias acerca del origen sudamericano de este género y su posterior migración a Norteamérica (Hunziker et al, 1972, 1973, en prensa; Hunziker, 1975; Wells y Hunziker, 1977). Por otro lado, Porter (1974) siguiendo a Turner (1973) sugiere un origen norteamericano del género Larrea con la subsecuente dispersión a Sudamérica. Una tercera hipótesis sería la de Barbour (1969) en la que la distribución disyunta de L. divaricata se habría originado por la evolución de los tipos de Chihuahua y Argentina a partir de un prototipo común transtropical que se habría extinguido.

Para obtener mayores evidencias acerca del origen del género Larrea se requiere mayor información anatómica, morfológica, palinológica y citológica de todos los géneros con los que se encuentra relacionado (Hunziker, 1975).

En la subfamilia Zygophylloideae existirían, según Porter (1974) ocho géneros relacionados en mayor o menor grado con Larrea. El único con distribución estrictamente norteamericana es Sericodes. Guaiacum se extiende desde Norte a Sudamérica a través de los trópicos. Los géneros Sisyndite y Neoluederitzia se distribuyen en el Sud Oeste de Africa. Bulnesia, Porlieria, Metharmé y Plectrocarpa serían estrictamente sudamericanos.

El género Bulnesia presenta distribución disyunta entre el Norte y el Sur de Sudamérica y está relacionado con Larrea, como se dijo anteriormente. B. arborea (Jacq.) Engler (Colombia y Venezuela) y B. carrapo Killip et Dugand (Colombia) se encuentran en la parte Norte mientras que las seis especies restantes son de la

parte sur: B. sarmientoi Lor. ex Griseb. (Argentina, Bolivia, Paraguay), B. bonariensis Griseb. (Argentina, Bolivia, Paraguay), B. foliosa Griseb. (Argentina, Bolivia, Paraguay), B. schickendantzii Hieron. ex Griseb. (Argentina), B. retama (Gill. ex Hook) (Argentina, Perú) y B. chilensis C. Gay (Chile). En este género la especiación primaria ocurre en Sudamérica pero, en contraste con Larrea, no se ha detectado hibridación ni migración a Norteamérica (Hunziker, 1975; Hunziker, en preparación).

Los géneros Plectrocarpa (ditípico, Argentina) y Metharme (monotípico, Chile) son estrictamente sudamericanos y están muy relacionados con Larrea. Según Engler (1896) podrían ser considerados como derivaciones tempranas de un tipo ancestral de Larrea (citado por Hunziker, 1975).

Porlieria sería estrictamente sudamericano, según Porter (1974) debería ser excluido de la lista de disyunciones transtropicales dado que P. angustifolia (Texas, NE de México) sería más similar a Guaiaacum coulteri y Guaiaacum unijugum que a las especies sudamericanas de Porlieria.

El género monotípico chileno Pintoa, conjuntamente con Guaiaacum, Porlieria, Bulnesia, Morkillia y Viscainoa (los dos últimos pertenecientes a la subfamilia Chitonioideae), formarían un grupo natural dentro de la familia (Porter, 1974).

Las relaciones filogenéticas dentro de la familia Zygophyllaceae son aún inciertas (Porter, ibid.) y la subfamilia Zygophylloideae, que es la más extensa, necesita estudios exhaustivos con la finalidad de determinar grupos naturales dentro de ella y establecer las relaciones existentes con las demás subfamilias.

En el presente trabajo se realizan estudios citológicos de doce especies en seis géneros de la subfamilia Zygophylloideae: Bulnesia (B. arborea, B. carrapo, B. bonariensis, B. schickendantzii, B. foliosa, B. retama y B. sarmientoi); Porlieria microphylla (Baill.) Descole, O'Don. et Lourt.; Plectrocarpa tetracantha Gill. ex Hook; Sericodes greggii A. Gray; Pintoa chilensis C. Gay.; y

Sisyndite sp. Se realizan, además, estudios citoespectrofotométricos en B. retama, B. foliosa, B. bonariensis y B. sarmientoi con el fin de establecer su contenido relativo de DNA y correlacionar este valor con el tamaño de los cromosomas. Se estudian mediante cromatografía los compuestos fenólicos en siete especies del género Bulnesia, Porlieria microphylla y Plectrocarpa tetracantha con el propósito de caracterizar químicamente las especies y géneros y tratar de dilucidar las relaciones entre ellos. En Bulnesia se emplean técnicas de taxonomía numérica y se obtienen resultados que se comparan con los demás datos obtenidos en el género.

Los resultados obtenidos en este trabajo proveen las bases para interpretar relaciones naturales entre las especies y los géneros estudiados. Estudios integrales que cubran la mayor cantidad de campos posibles establecerán una clasificación más natural de la familia Zygophyllaceae y, en especial, de la subfamilia Zygo phylloideae.

II.- MATERIALES

Los ejemplares de herbario de los materiales estudiados se encuentran depositados en los siguientes herbarios: Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de Buenos Aires (BAFC), Gray Herbarium (GH) y Museo Botánico de Córdoba (CORD). La recolección e identificación de los mismos fue realizada por E. Di Fulvio, P. Goldblatt, J.H. Hunziker, C.A. Naranjo, R.A. Palacios, R. Rollins, F. Vervoorst y O. Zöllner.

Bulnesia arborea: Colombia, Dpto. Bolívar, Cartagena, La Popa=J.H. H. 9611, 9609, 9476, 9477, 9479, 9480, 9481, 9613 (BAFC).- Venezuela, Estado Carabobo, ca. Pto. Cabello=J.H.H. 9033, 9035 (BAFC); Estado Lara, 10 Km al SW de Barquisimeto=J.H. H. 9037 (BAFC); 15 Km al SW de Barquisimeto=J.H.H. 9038 (BAFC); 20 Km al SW de Barquisimeto=J.H.H. 9039 (BAFC); 5 Km al NE de Quibor=J.H.H. 9040 (BAFC); alrededores de Carrora=Tillett 7311 (642 a,b,c); Estado Aragua Maracay, centro al fondo del Instituto de Botánica=J.H.H. 9041, 9042 (BAFC).-

Bulnesia carrapo: Colombia, Dpto. Tolima, Honda, cultivado en finca=J.H.H. 9449, 9618, 9619 (BAFC); Dpto. Cundinamarca, 8 Km al S de Pto. Bolívar, Finca Las Margaritas=J.H.H. 9622, 9623 (BAFC).-

Bulnesia bonariensis: Argentina, prov. Salta, Dpto. Metán, Ruta 34, Río Pasaje o Juramento=J.H.H., C.A.N. et R.A.P. 9211 (BAFC). Prov. Tucumán, Dpto. Trancas, Vipos=J.H.H., C.A.N. et R.A.P. 9205, 9206 (BAFC).-
Prov. La Rioja, Dpto. Gral. Belgrano, Iliar, 10 km al S de Olta=J.H.H., C.A.N. et R.A.P. 9046, 9048, 9490 (BAFC); 8 Km al S de Olta=J.H.H., C.A.N. et R.A.P. 9134 (BAFC); 3 Km al S de Iliar=J.H.H., C.A.N. et R.A.P. 9493 (BAFC);

Dpto. Independencia, Ruta Nac. 38, entre Patquía y el Estanquito=J.H.H., C.A.N. et R.A.P. 9142, 9153, 9154 (BAFC).-

Bulnesia foliosa: Argentina, prov. Tucumán, Dpto. Trancas, entre Trancas y Vipos=J.H.H., C.A.N. et R.A.P. 9202 (BAFC); entre Vipos y Tapia=F. Ververorst (s/nº) (BAFC).-

Prov. Catamarca, Dpto. Capital, alrededores de Choya=J.H.H., C.A.N. et R.A.P. 9159 (BAFC); Dpto. Fray Mamerto Esquiú, Dique Pirquitas=J.H.H., C.A.N. et R.A.P. 9163 (BAFC); Dpto. Capayán, Ruta 38, entre Huillapima y Miraflores=J.H.H., C.A.N. et R.A.P. 9593 (BAFC).-

Prov. La Rioja, Dpto. Gral. Ocampo, Dique de Anzulón=J.H.H., C.A.N. et R.A.P. 9126, 9127, 9124, 9129 (BAFC); entre el Dique de Anzulón y Olpas=J.H.H., C.A.N. et R.A.P. 9133, 9135 (BAFC); Dpto. Independencia, Ruta Nac. 38, entre Patquía y el Estanquito=J.H.H., C.A.N. et R.A.P. 9144, 9146, 9150, 9147 (BAFC); Dpto. Gral. Belgrano, Iliar, 10 Km al S de Olta=J.H.H. 9491 (BAFC).-

Bulnesia schickendantzii: Argentina, prov. Salta, Dpto. San Carlos, Angastaco=J.H.H., C.A.N. et R.A.P. 9024 (BAFC).-

Prov. Catamarca, Dpto. Andalgalá, alrededores de Andalgalá=J.H.H., C.A.N. et R.A.P. 9188 (BAFC); entre Andalgalá y Cuesta de la Chilca=J.H.H., C.A.N. et R.A.P. 9195 (BAFC); Dpto. Tinogasta, Río Guanchín, 9 Km al E de Lorohuasi=J.H.H., C.A.N. et R.A.P. 9558 (BAFC).-

Bulnesia retama: Argentina, prov. Catamarca, Dpto. Andalgalá, entre Andalgalá y Cuesta de la Chilca=J.H.H.; C.A.N. et R.A.P. 9192, 9194 (BAFC).-

Prov. La Rioja, Dpto. Independencia, Ruta Nac. 38, entre Patquía y El Estanquito=J.H.H., C.A.N. et R.A.P. 9139, 9152 (BAFC); 1 Km al NW de Patquía=408 (Nº cult.); Dpto. Capital, 17 Km al NE de Cebollar, Ruta Nac. 38=J.H.H., C.A.N. et R.A.P. 9157 (BAFC); Quebrada de la Cébila=J.H.

H., C.A.N. et R.A.P. 9651 (BAFC) (Nº cult. 423); Dpto. Gral. Roca, Ruta Prov. 29=J.H.H., C.A.N. et R.A.P. 9113 (BAFC).-

Prov. San Juan, Dpto. Calingasta, Ruta 207, 75 Km antes de Calingasta=J.H.H., C.A.N. et R.A.P. 9084 (BAFC); entre Tamberías y Calingasta=J.H.H., C.A.N. et R.A.P. 9092 (BAFC); Dpto. Caucete, Ruta 20 entre Bermejo y Marayes=J. H.H., C.A.N. et R.A.P. 9103, 9105 (BAFC); 12 Km al E de Bermejo=J.H.H., C.A.N. et R.A.P. 9099 (BAFC).-

Prov. San Luis, Dpto. Capital, Ruta 8, Km 824 entre San Luis y Pescadores=J.H.H., C.A.N. et R.A.P. 9059, 9061 (BAFC).

Prov. Mendoza, Dpto. Las Heras, 20 Km al N de Mendoza, ruta 7=J.H.H., C.A.N. et R.A.P. 9066, 9069 (BAFC).-

Bulnesia sarmientoi: Argentina, prov. Salta, Dpto. Gral. José de San Martín, 2 Km al W de Hickmann=J.H.H., C.A.N. et R.A.P. 9216 (BAFC); 9 Km al W de Hickmann=J.H.H., C.A.N. et R.A.P. 9214 (BAFC); 10 Km al E de Hickmann=J.H.H., C.A.N. et R.A.P. 9217 (BAFC); 4 Km al E. de Dragones=J.H.H., C.A.N. et R.A.P. 9219 (BAFC); 6 Km al E de Padre Lozano=9212 (BAFC); Dpto. Rivadavia, 14 Km al E de Dragones=J.H.H., C.A.N. et R.A.P. 9220 (BAFC).-

Prov. Formosa, Dpto. Matacos, 14 Km al E del límite con Salta=J.H.H., C.A.N. et R.A.P. 9223 (BAFC); Dpto. Pilcomayo, Ruta 95, Riacho Monte Lindo=R.A.P. 471 (BAFC).-

Plectrocarpa tetracantha: Argentina, prov. La Rioja, Dpto. Arauco=J.H.H. 9646 (BAFC); Dpto. Independencia, alrededor de 1 Km al NW de Patquía=409 (Nº de cult.).-

Prov. San Juan, Dpto. Caucete, 12 Km al E de Bermejo=J.H.H., C.A.N. et R.A.P. 9097 (BAFC).-

Porlieria microphylla: Argentina, prov. Tucumán, Dpto. Trancas, entre Tapia y Vipos=J.H.H., C.A.N. et R.A.P. 9201 (BAFC).-

Prov. Córdoba, cerca del Vado de Villa Belgrano=J.H.H.
9043, 410 (Nº cult.);-Dpto. Colón, entre La Calera y El
Diquecito=E. Di Fulvio 375 (CORD).-

Sisyndite sp.: Sudafrica, Little Namaqualand, Anenous Park=Goldblat
1853.-

Sericodes greggii: México, Estado de Coahuila, mitad de camino en
tre San Pedro y Cuatro Ciénagas=R. Rollins 7447 (GH).-

Pintoa chilensis: Chile, Atacama, Nantoco, ca. Tierra amarilla=O.
Zöllner 7047.-

III.- CROMOSOMAS

III.1.- Introducción

La utilización de los caracteres citológicos para resolver problemas taxonómicos ha sido denominada citotaxonomía. Las diferencias cromosómicas entre entidades deben ser consideradas por el taxónomo al elaborar su clasificación. Las relaciones entre grupos naturales de especies no pueden considerarse completos en un sentido evolutivo sin buenos datos citotaxonómicos que refuercen las conclusiones basadas en criterios morfológicos (Swanson, 1957). Conjuntamente con otros datos como sistema reproductivo, habitat, morfología general y palinología, los cromosomas pueden ser muy útiles indicando la dirección de la evolución en muchos grupos.

El conjunto de características del complemento cromosómico de una especie ha sido denominado cariótipo. Dichas características son: 1) número básico; 2) tamaño absoluto de los cromosomas; 3) tamaño relativo de los cromosomas; 4) posición del centrómero; 5) número, tipo y posición de satélites; 6) cantidad y distribución de heterocromatina; y 7) bandeo según nuevas técnicas (fluorescencia, Giemsa, etc.).

El cariótipo está sujeto a variaciones al igual que otros caracteres sistemáticos. En general, un cariótipo es representativo de una especie, lo que ha sido confirmado en muchos géneros de plantas y animales, aunque hay casos donde un cariótipo en particular es representativo del género como en Ephedra (Hunziker, 1948), Hippeastrum (Naranjo y Andrada, 1975). Por otro lado, pueden ocurrir rearrreglos cromosómicos que, por ser muy pequeños o simétricos no alteren la apariencia visible del cromosoma, por lo tanto un cambio en la estructura del genomio puede producirse sin que exista, necesariamente, un cambio cariotípico visible.

El número básico es una de las características cariotípicas más usadas en estudios biosistemáticos en base al cual se han

esbozado muchas hipótesis filogenéticas en diversos grupos. Esto se debe, probablemente, a la gran diversidad existente de números cromosómicos, su frecuente correlación con grupos taxonómicos, la constancia que en general manifiesta dentro de especies y poblaciones y a la relativa facilidad de su determinación en relación con otras características del cariótipo.

El número básico puede sufrir alteraciones aneuploides o poliploides. Las variaciones aneuploides forman series consecutivas de números gaméticos en especies relacionadas. Si la serie es descendente la reducción en el número de cromosomas se debería a la pérdida de centrómeros y de las zonas heterocromáticas adyacentes genéticamente inertes mediante translocaciones desiguales o fusión céntrica. Si un fragmento céntrico, que consiste de un centrómero y de heterocromatina y que normalmente se pierde en las sucesivas generaciones, recibe por translocación una porción de eucromatina de otro cromosoma, entonces ese cromosoma contendrá material genético activo y esencial y será mantenido por selección natural dando lugar de esta manera a una serie ascendente (Darlington, 1964).

La variación más común en el número cromosómico involucra la poliploidía. Grupos con diploides y poliploides están unificados mediante el número básico que está representado por el número gamético de las especies diploides. Las dificultades surgen cuando los diploides se han extinguido y una inferencia del número básico ancestral se hace difícil, ya que no sólo la poliploidía sino también la aneuploidía podrían haberlo modificado. Las tendencias evolutivas han ocurrido en diferentes direcciones en distintos grupos; en algunos es descendente, como por ejemplo en Crepis donde las especies más primitivas desde un punto de vista taxonómico tienen números cromosómicos más altos que las más especializadas; en Clarkia la serie es ascendente excepto en una sección, mientras que en Dorstenia es descendente en el Viejo Mundo y ascendente en el Nuevo Mundo (Stebbins, 1971). No hay reglas ni tendencias defi

nidas en este aspecto y deben realizarse estudios en el grupo en particular relacionando el número básico con otros hechos y características con significado evolutivo.

La variación en el tamaño absoluto de los cromosomas, incluyendo el contenido de DNA del núcleo, puede ocurrir entre familias, entre géneros o entre especies del mismo género. Si se comparan las plantas vasculares con musgos, algas, hongos y microorganismos, se observa que los cromosomas de las plantas vasculares son, en general, de mayor tamaño, lo que indicaría una tendencia evolutiva hacia un incremento en tamaño cromosómico y contenido nuclear, paralelos a una complejidad estructural creciente. Por otro lado, esta tendencia no se observa cuando diferentes grupos de plantas vasculares son estudiados, ya que se ha visto que familias altamente especializadas poseen cromosomas de menor tamaño y menor contenido de DNA nuclear que plantas más primitivas. En diferentes grupos de plantas superiores la tendencia es tanto al aumento como a la disminución (Stebbins, 1971). De las investigaciones y especulaciones realizadas hasta el momento se deduce que no existen aún reglas o leyes que puedan ser aplicadas en la determinación de la dirección de los cambios en las dimensiones cromosómicas.

Diferencias en el tamaño relativo de los cromosomas podrían deberse a intercambios de segmentos mediante la ocurrencia de translocaciones desiguales.

Las diferencias en el número y posición de satélites reflejan diferencias en el tamaño y localización de la región organizadora del nucleolo.

En cuanto a la morfología general del cariotipo puede considerarse que un cariotipo es simétrico si los cromosomas que lo integran son aproximadamente del mismo tamaño y poseen centrómeros medianos o submedianos; asimétrico sería cuando los cromosomas son de diferentes tamaños o los centrómeros ocupan una posición terminal o subterminal. Pueden establecerse varios grados de asimetría dependiendo del tamaño y proporción de cromosomas acrocéntricos o

telocéntricos (Stebbins, 1971). Se han observado varias tendencias en cuanto a la variación del cariótipo:

- 1) aumento de asimetría asociada con decrecimiento en el número cromosómico y especialización creciente en cuanto a ciertas características morfológicas (Crepis);
- 2) asimetría creciente asociada con aumento en el número cromosómico y algunas características más especializadas (Clarkia);
- 3) asociación de dos números básicos con poca diferencia en la simetría del cariótipo (Ranunculus, Allium).

La tendencia predominante en las angiospermas sería hacia la asimetría creciente, aunque se han detectado muchas reversiones a esta tendencia. La comparación del número básico y la morfología cromosómica pueden, en muchos casos, sugerir el verdadero curso de los eventos; existen casos, sin embargo, donde podrían existir ciclos de simetría-asimetría que confundirían la relación secuencial entre cariótipos (Jones, 1970).

Los datos cromosómicos son, en muchos casos, muy útiles en la predicción de especulaciones filogenéticas e interpretaciones de relaciones entre grupos pero hay que tener en cuenta que, debido a su reversibilidad, hay cambios cromosómicos que pueden dar un significado equívoco en cuanto a su implicación evolutiva y deben, por lo tanto, ser analizados con mucho detenimiento y en conjunción con otro tipo de datos.

Los estudios citotaxonómicos incluyen, además de los estudios de cariótipo ya mencionados, el análisis del apareamiento cromosómico durante la meiosis. Estos estudios son particularmente útiles para estudiar las relaciones entre especies, siendo el apareamiento cromosómico en híbridos interespecíficos un dato que usado cuidadosamente y teniendo en cuenta todos los factores involucrados en el proceso, puede dar valiosa información al respecto. También es de sumo valor el estudio del comportamiento meiótico de los poliploides con el fin de determinar su origen.

Las diferencias cromosómicas reflejan diferencias en la fuente de variación genética, mientras que las diferencias morfológicas, fisiológicas y bioquímicas reflejan diferencias en los productos de la acción génica, modificados por el medio (Stebbins, 1971). Para poder analizar los límites entre distintas entidades desde un punto de vista taxonómico, con un criterio evolutivo de las relaciones entre ellas, se deberán tener en cuenta no sólo las diferencias cromosómicas sino también las morfológicas, ecológicas, fisiológicas y bioquímicas.

En esta sección se realizan estudios citológicos de doce especies en seis géneros de la subfamilia Zygophylloideae determinando número básico, comportamiento mitótico y meiótico y análisis del cariotipo en los casos donde fue posible su estudio.

III.2.- Métodos

La procedencia de los materiales estudiados se detallan en la Tabla 1.

Los recuentos mitóticos fueron realizados en ápices de raicillas provenientes de semillas que fueron escarificadas mecánicamente. La raíz primaria fue cortada cuando tenía 1,5 cm aproximadamente y luego pretratada durante 5 horas a 18°C con una solución 0,002M de 8-oxyquinoleína. La fijación fue hecha en una mezcla 3:1 de alcohol etílico:ácido acético glacial. Luego se realizó una hidrólisis con ácido ClH 1N durante 8 min. a 60°C y se lavó el ápice con agua destilada. La tinción se realizó con hematoxilina acética 2% en ácido acético 45% y citrato férrico como mordiente (Sáez, 1960; Nuñez, 1968).

Los estudios meióticos fueron realizados en flores previamente fijadas en Newcomer modificado (Hunziker, 1966). La tinción

fue hecha con hematoxilina acética como fue indicado para mitosis.

La nomenclatura usada para la descripción de la morfología cromosómica es la propuesta por Levan et al (1964). De acuerdo a ella los cromosomas pueden ser divididos en tres grupos: cromosomas m (índice centromérico $Ic = \text{longitud del brazo corto} \times 100 / \text{longitud total del cromosoma} = 50-37.5$); cromosomas sm ($Ic = 37.5-25$) y cromosomas st ($Ic = 25-12.5$).

III.3.- Resultados

Se han estudiado los cromosomas somáticos de las siete especies conocidas del género Bulnesia, las cuales mostraron ser diploides ($2n=26$) excepto B. bonariensis Griseb. que sería tetraploide ($2n=52$) (Tabla 1, figs. 1 A-E). Las especies de este género presentan diferencias en el tamaño de sus cromosomas. B. sarmientoi Lor. ex Griseb. sería la especie que posee los cromosomas de menor tamaño. En B. retama que posee los de mayor tamaño, el cariótipo estaría compuesto de $4\text{m} + 12\text{sm} + 10\text{st}$ (Fig. 1 A y 3). En el resto de las especies no se ha podido estudiar totalmente el cariótipo debido al pequeño tamaño de los cromosomas, pero en B. schickendantzii Hieron. ex Griseb. se ha podido establecer, en base al estudio de una célula, que poseería un cariótipo compuesto por $14\text{m} + 12\text{sm}$ ó $14\text{m} + 12\text{st}$ (Fig. 1B). La diferencia de tamaño de los cromosomas de B. retama con respecto a los de las restantes especies llama la atención. Se trata de una diferencia mayor que la observada entre las especies restantes o dentro de una especie debido a variaciones en la técnica utilizada.

El fenómeno de polisomatía se presenta con bastante frecuencia dentro del género, en la Tabla 1 se indican los recuentos polisomáticos entre paréntesis. En la fig. 1E se observa una célula polisomática con $2n = 10^4$ cromosomas de B. bonariensis.

Se han estudiado, además, los cromosomas meióticos en cinco de las siete especies de Bulnesia, en las cuales se ha confirmado su condición diploide con $n = 13$ (Tabla 1, Figs. 2A-D). En B. retama se han estudiado 70 células en prometafase y metafase I, el comportamiento meiótico fue regular formándose siempre 13 II (bivalentes). En dichas metafases I se observó que usualmente 11 II se disponen en la perifería de la placa ecuatorial y dos en el centro (Figs. 2A y B). Uno de los últimos correspondería al par m pequeño N° 2 (Fig. 3), dado que es el bivalente de menor tamaño. Dicha disposición cromosómica, que también fue observada en metafase II, probablemente se deba a que la distancia entre los polos del huso acromático sea relativamente corta y al realizar el aplastado las células sean observadas en vista polar. B. carrapo Killip et Dugand tiene un comportamiento meiótico regular observándose la formación de 13 II en 86 células estudiadas en prometafase y metafase I (Fig. 2C). En B. foliosa Griseb. se estudiaron 28 prometafases y metafases I donde se contaron 13 II (Fig. 2D). En B. schickendantzii y B. arborea (Jacq.) Engl. se estudiaron 23 y 7 células respectivamente y al igual que en los casos anteriores, el comportamiento meiótico fue regular con formación de 13 II.

Plectrocarpa tetracantha Gill. ex Hook. presentó un comportamiento meiótico regular con 13 II en las 15 prometafases y metafases I estudiadas (Tabla 1, Fig. 2E).

En Porlieria microphylla (Baill.) Descole, O'Don. y Lourt. fueron estudiadas 73 placas metafásicas mitóticas pertenecientes a 8 individuos, que mostraron $2n = 52$ (Tabla 1, Fig. 1F). Además, se encontraron 4 metafases que mostraron claramente 10^4 cromosomas. Esto último representa un 5,2 % de polisomatía. En metafase I se observaron 26 bivalentes.

Pintoa chilensis C. Gay tiene un número cromosómico $2n = 20$ (Tabla 1, Fig. 1G) lo cual se dedujo del estudio de 8 claras metafases mitóticas en dos individuos. Su cariótipo es bimodal y tiene un par de cromosomas m pequeños. Dado que sólo presenta un par de dichos cromosomas, esta especie sería diploide con un número básico $x = 10$.

En Sisynchite sp. se han estudiado 20 metafases mitóticas en 3 individuos observándose en todos los casos $2n = 20$ (Tabla 1, Fig. 1H). Como puede observarse en la figura, el par mayor del complemento es m y en algunas células se ha visto que la constricción centromérica se presenta muy estirada.

En Sericodes greggii A. Gray fueron estudiadas 25 diacinesis y prometafases I mostrando en todas ellas 15 II, o sea que posee $n = 15$ (Tabla 1, Fig. 2F). También se estudiaron claras metafases meióticas II que poseían 15 cromosomas.

TABLA 1.- Número de herbario y números cromosómicos del material estudiado.

<u>E s p e c i e</u>	<u>H e r b a r i o</u>	<u>n</u>	<u>2n</u>
<u>Bulnesia arborea</u> (Jacq.)Engler	J.H.Hunziker 9613 (BAFC)	13	26
<u>B. bonariensis</u> Griseb.	J.H.Hunziker, C.A. Naranjo y R.A.Pala cios 9205 (BAFC)	-	52 (104)
	J.H.Hunziker 9493	-	52 (104)
<u>B. carrapo</u> Killip et Dugand	J.H.Hunziker 9619 (BAFC)	-	26(52,104)
	J.H.Hunziker 9623 (BAFC)	13	-
<u>B. foliosa</u> Griseb.	J.H.Hunziker, C.A. Naranjo y R.A.Pala cios 9202 (BAFC)	-	26
	Leg. F. Vervoorst Dic. 22/1970	13	-
<u>B. retama</u> (Gill. ex Hook) Griseb.	J.H.Hunziker, C.A. Naranjo y R.A.Pala cios 9099 (BAFC)	-	26 (52)
	J.H.Hunziker, C.A. Naranjo y R.A.Pala cios 9105 (BAFC)	13	-
<u>B. sarmientoi</u> Lor. ex Griseb.	J.H.Hunziker, C.A. Naranjo y R.A.Pala cios 9216 (BAFC)	-	26 (52)
<u>B. schickendantzii</u> Hieron. ex Griseb.	J.H.Hunziker, C.A. Naranjo y R.A.Pala cios 9195 (BAFC)	-	26 (52)
	J.H.Hunziker, C.A. Naranjo y R.A.Pala cios 9024 (BAFC)	13	-
<u>Pintoa chilensis</u> C. Gay	O. Zöllner 7047	-	20
<u>Plectrocarpa tetraantha</u> Gill. ex Hook.	J.H.Hunziker 9646 (BAFC)	13	-
<u>Porlieria microphylla</u> (Baill.) Descole, O'Don. et Lourt.	J.H.Hunziker 9043 (BAFC)	-	52 (104)
	E. Di Fulvio 375	26	-
<u>Sisyndite</u> sp.	Goldblatt 1853	-	20
<u>Sericodes greggii</u> A. Gray	R. Rollins 7447 (GH)	15	-

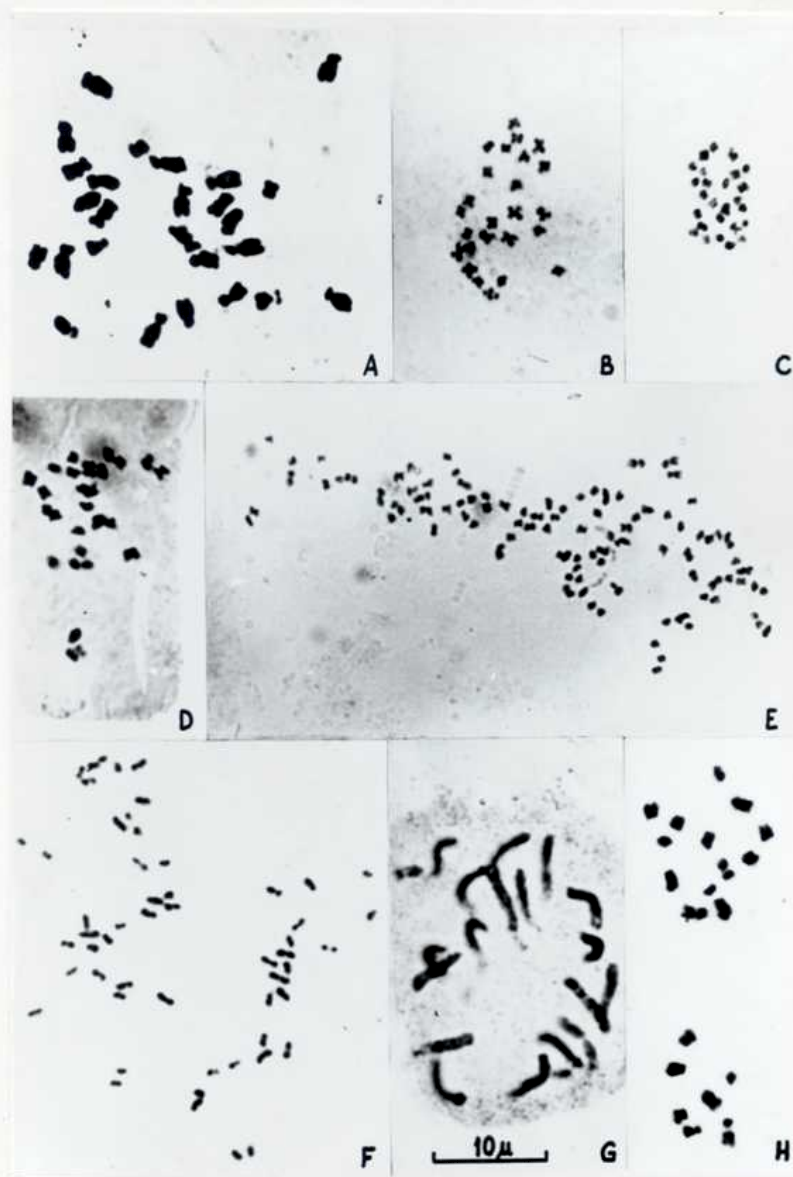


Figura 1.- Metafases mitóticas de: A = Bulnesia retama (J.H.H., C. A.N. y R.A.P. 9099) $2n = 26$ (con esta fotomicrografía ha sido construido el cariograma de la Fig. 3). B y C = B. schickendantzii (J.H.H., C.A.N. y R.A.P. 9195) $2n = 26$; en B un cromosoma ha quedado fuera del plano de foco de la fotomicrografía. D = B. foliosa (J.H.H., C.A.N. y R.A.P. 9202) $2n = 26$. E = B. bonariensis (J.H.H. 9493) célula polisomática con 10^4 cromosomas. F = Porlieria microphylla (J.H.H. 9043) $2n = 52$. G = Pintoa chilensis (O. Zöllner 7047) $2n = 20$. H = Sisyndite sp. (Goldblatt 1853) $2n = 20$. A - H, todas con igual aumento.

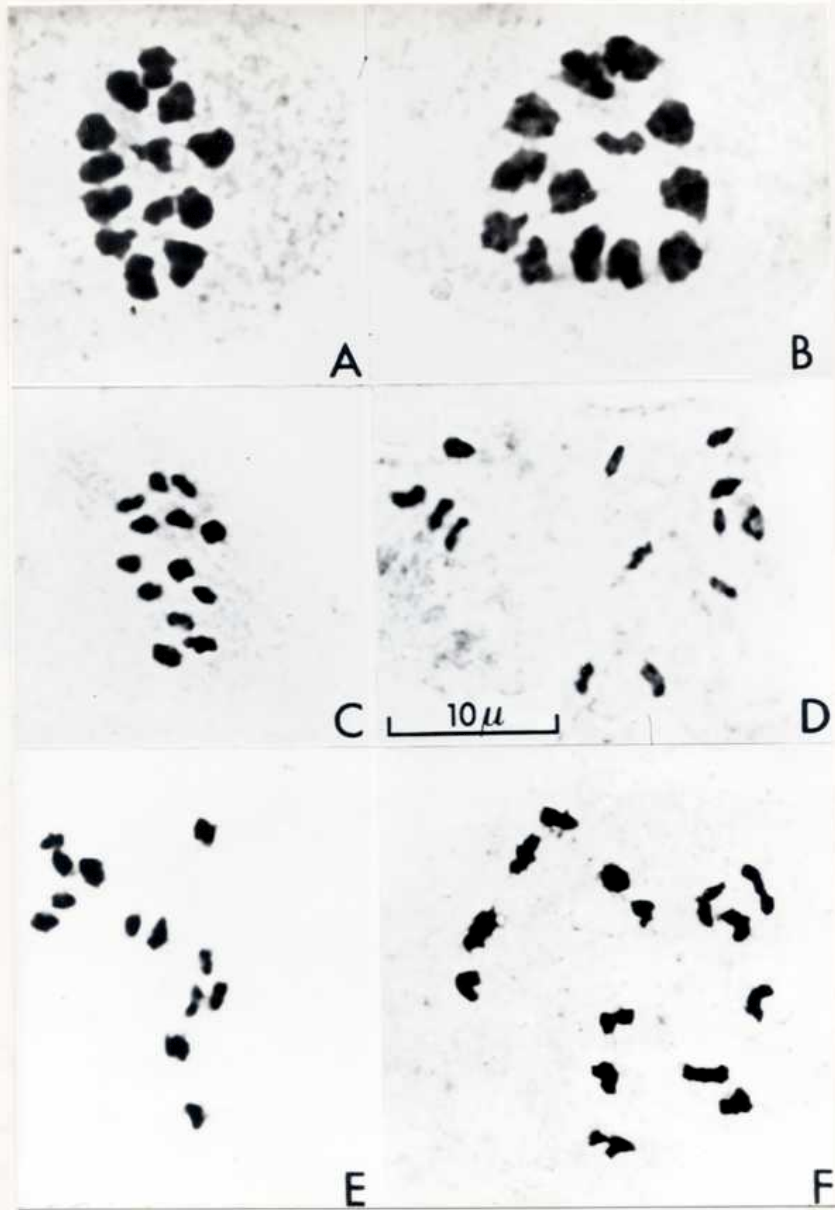


Figura 2.- A, B, C, D = metafases I. D y F = prometafases I. A y B = Bulnesia retama (J.H.H., C.A.N. y R.A.P. 9105) 13 II (bivalentes). C = B. carrapo (J.H.H. 9623) 13 II. D = B. foliosa (F.V. Vervoorst, 22/XII/70) 13 II. E = Plectrocarpa tetraacantha (J.H.H. 9646) 13 II. F = Sericodes greggii (R.R. 7447) 15 II. A-F, todas con igual aumento.

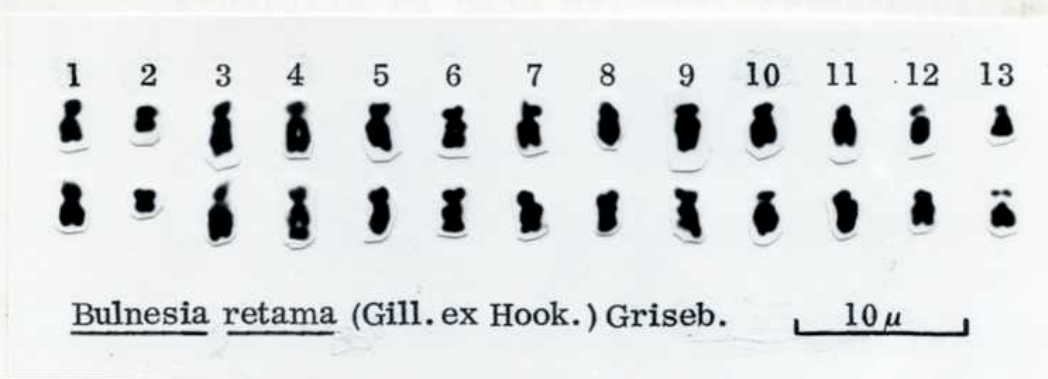


Figura 3.- Cariograma de Bulnesia retama compuesto por 4 m + 12 sm + 10 st, fue construido con la fotomicrografía de la Fig. 1 A. Explicación en el texto.

IV.- CROMATOGRAFIA DE COMPUESTOS FENOLICOS

IV.1.- Introducción

Los caracteres químicos han sido empleados en taxonomía, especialmente desde el advenimiento de métodos modernos de análisis como el desarrollo de técnicas simples y rápidas de cromatografía en papel, cromatografía en capa delgada, cromatografía gaseosa y electroforesis.

Cuando se elabora una clasificación natural es importante obtener datos de todas las áreas posibles. La mayoría de las clasificaciones elaboradas hasta el momento han sido hechas exclusivamente en base a datos morfológicos, lo cual no es de ninguna manera criticable puesto que en la evaluación de este tipo de datos se tienen en consideración un número considerable de genes. Cuando se analizan datos químicos es probable que el número de genes considerados sea menor con respecto a los analizados en estudios morfológicos, por lo tanto, estos resultados deben ser adicionados a los obtenidos por estudios morfológicos, citológicos, anatómicos y genéticos, obteniéndose así una clasificación natural integrada que es la que más se acercará a la realidad evolutiva del grupo estudiado.

La taxonomía química, puede, en algunos casos, obviar problemas de convergencia y divergencia, pues resulta difícil pensar que las convergencias y divergencias morfológicas y químicas coincidan. Los caracteres químicos y morfológicos pueden evolucionar en direcciones distintas bajo presiones de selección diferentes (Hsiao, 1973).

Así como en el caso de especies crípticas o muy parecidas, la taxonomía química ayudaría a encontrar las diferencias existentes entre ellas, en casos donde la divergencia morfológica de un grupo ha sido mayor los datos químicos señalarían semejanzas que podrían ser una medida más real de las relaciones entre ellas.

Para que un compuesto químico sea útil en estudios sistemáticos debe reunir varias condiciones:

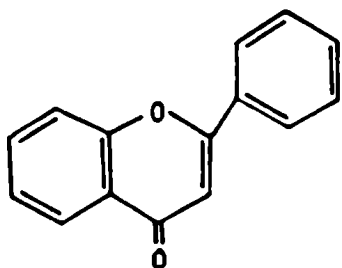
- a) No debe ser muy simple estructuralmente permitiendo cierta variabilidad;
- b) Debe tener estabilidad frente a factores fisiológicos;
- c) Debe ser de amplia distribución;
- d) Ser fácilmente detectable e identificable.

Un grupo de compuestos que cumplen con estos requisitos son, entre otros, los flavonoides. Estos compuestos, que no están involucrados directamente en el metabolismo primario, han sido denominados, conjuntamente con otros, compuestos secundarios debido a que no están correlacionados con la formación del vegetal ni con la mantención de sus actividades (Doby, 1965). Se encuentran presentes en la madera, hojas, flores, frutos y semillas de las plantas.

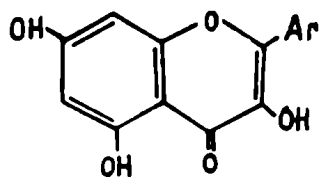
Estructuralmente están relacionados con la flavona: 2-fenil benzopirona (Fig. 4); la variación estructural es muy amplia y es debida a diferentes niveles de oxidación del anillo pirano central y a la presencia de un número variable de hidroxilos u otros sustituyentes unidos a los dos anillos benceno. Los flavonoides se dividen en clases dependiendo del nivel de oxidación del anillo pirano; las clases más frecuentes en la naturaleza son: antocianidinas, flavonas, flavonoles, flavan (3-4 diols); las flavanonas, chalconas, auronas e isoflavonas son menos frecuentes (Fig. 4). Como la mayoría de los flavonoides en plantas se encuentran como glicósidos (unidos a un azúcar), la principal fuente de variación estructural reside en el tipo de azúcar y el tipo de unión de la misma (Harborne, 1972). Los glicósidos son solubles en agua y están localizados, generalmente, en las vacuolas celulares.

Los flavonoides tienen distribución universal. Son característicos de las plantas vasculares y son raros o están ausentes en otro tipo de plantas. Habría una relación entre capacidad de

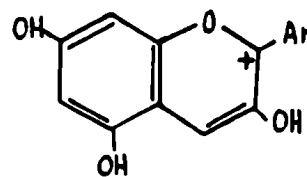
TIPOS DE FLAVONOIDES¹



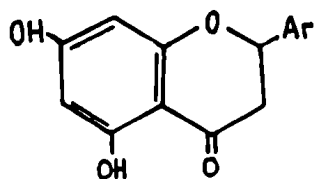
Flavona



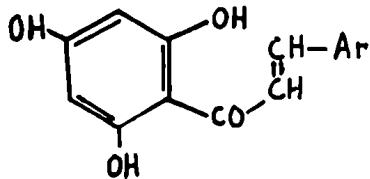
Flavonol



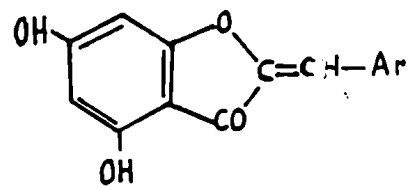
Antocianidina



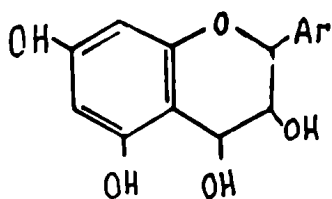
Flavonona



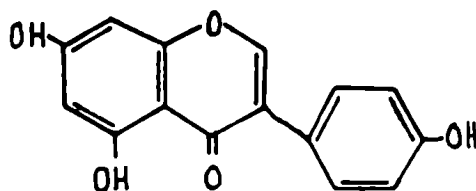
Chalcona



Aurona



Flavan 3,4-diol



Isoflavona (Genisteina)

1. Modificado de Harborne (1972)

Figura 4

producción de flavonoides y lignificación, ambos caracteres estarían relacionados filogenéticamente (Harborne, 1972). Los grupos morfológicamente primitivos como musgos y helechos poseen flavonoides estructuralmente más simples que las angiospermas. Lo mismo ocurre con las gimnospermas siendo sus flavonoides más sencillos que los de las angiospermas. Se observaron diferencias entre las especies herbáceas y leñosas; en cambio, las diferencias entre monocotiledóneas y dicotiledóneas no fueron significativas (Harborne, 1972).

Los flavonoides son sustancias muy estables y pueden ser detectadas en ejemplares de herbario con varios años de recolección (Harborne, 1972; Heywood, 1970); esto resulta de suma utilidad ya que es frecuente que existan dificultades para conseguir material vivo de todos los taxones que se estudian. Por otro lado, Hsiao (1973) opina que podrían existir diferencias entre los cromatogramas obtenidos de material vivo y de ejemplares de herbario. Estos compuestos pueden ser detectados o identificados rápidamente por estudios cromatográficos y espectrales.

Se han establecido algunas funciones de estos compuestos en hojas y otros órganos vegetales, pero este aspecto no está aún totalmente aclarado. Se ha sugerido que serían importantes en:

- 1) Coloración de las flores que atraen a los polinizadores (abejas, pájaros, mariposas, etc.). La hidroxilación es un factor clave en la producción de color en la molécula de flavonoides: por ejemplo, la introducción de un simple hidroxilo en un compuesto no coloreado como quercetina puede dar lugar a un compuesto coloreado (Harborne, 1972);
- 2) Algunos flavonoides poseen propiedades gustativas, pudiendo ser amargos, dulces o sin sabor, esto es muy importante si se considera la relación planta-insecto. En Citrus el gusto amargo de la naringina repelería insectos depredadores. Flavonoides amargos se han encontrado en hojas de varios vegeta-

les y éstos podrían desempeñar una función protectora (Harborne, 1972). Goldstein y Swain (1963) determinaron que la presencia de oligómeros son importantes en las propiedades gustativas. Tienen la capacidad de acomplejarse con proteínas y probablemente ese hecho les confiera el sabor astringente;

- 3) Las defensas anti-herbívoras de las plantas consisten, aparentemente, de dos estrategias básicas. Muchos compuestos químicos en plantas poseen efectos tóxicos sobre los procesos metabólicos que ocurren dentro de los herbívoros. En general, los flavonoides no son tóxicos pero en algunos casos se han encontrado que ciertos flavonoles lo serían en animales; si bien la rutina (quercetina 3-rutinósido) es de amplia distribución en frutas y vegetales, se ha encontrado que Heliothis virescens y H. zea son repelidos por quercetina y sus derivados resultando tóxicas a determinadas concentraciones (Harborne, 1972). Un sistema defensivo mediante sustancias que reducen la digestibilidad ha sido encontrado por Feeny (1969) en Quercus robur L. donde los taninos y las proteínas de la planta se acomplejan al producirse la maceración de las hojas por el herbívoro. Estos complejos son resistentes a la degradación enzimática de las enzimas proteolíticas del herbívoro. En Larrea tridentata y L. cuneifolia Rhoades (1977) ha encontrado que los constituyentes resinosos fenólicos de las hojas formarían complejos con las proteínas y almidones haciéndolos, al igual que en el caso anterior, resistentes a la degradación enzimática por las enzimas proteolíticas del herbívoro. También pueden complejarse las enzimas del herbívoro. Los complejos resina-proteína podrían estabilizarse mediante la formación de puentes de hidrógeno entre grupos hidroxilo fenólicos y peptido carbonilos como ocurre en el mecanismo de formación del complejo tanino-proteína. Además, el sistema fenoloxidasas presente en

los tejidos vegetales provocaría la oxidación de los componentes de la resina (principalmente catecoles) a quinonas, las cuales ligan los complejos mediante puentes covalentes, haciéndolos aún más refractarios a la digestión;

- 4) La relación con el crecimiento de la planta es aún materia de controversia. Los flavonoides a concentraciones fisiológicas pueden inhibir o estimular un sistema enzimático que "in vitro" destruye el ácido indolacético (hormona del crecimiento muy importante en plantas) convirtiéndolo en un producto inactivo;
- 5) Un grupo de flavonoides muy interesante son los isoflavonoides. Se ha encontrado que pueden actuar como sustancias protectoras frente a ataques fúngicos. La pisantina es una isoflavona que se produce como respuesta a ataque fúngico en arvejas y previene la invasión de hongos patógenos. Los isoflavonoides pueden mimetizar esteroides por su tamaño y, por otro lado, se sabe que algunos hongos requieren esteroides para producción de oosporas, entonces sería posible que la pisantina reemplace los esteroides normales en las células fúngicas (Harborne, 1972);
- 6) Algunos flavonoides poseerían actividad antimicrobiana (McClure, 1975 en Mabry et al (1977)).

En las plantas superiores, el pasaje de carácter leñoso al herbáceo está correlacionado con tres cambios importantes en los flavonoides de las hojas:(Harborne, 1972)

- a) desaparición de las leucoantocianidinas;
- b) pérdida de trihidroxilación del anillo B;
- c) reemplazo de flavonol por flavona;

El estudio de compuestos fenólicos ha permitido obtener información muy valiosa acerca de las relaciones entre taxa (Brehm and Ownbey, 1965; Dedio et al, 1969; Früst and Holm, 1972; Hsiao, 1973; Ornduff et al, 1973; Smith and Levin, 1963; Stebbins et al, 1963).

Estos compuestos son muy útiles para la resolución de problemas especiales tales como el origen de híbridos y aloploidos o los efectos del aislamiento geográfico o ecológico en ciertos grupos (Alston, 1965; Alston and Turner, 1962, 1963; Hunziker et al, 1973, en prensa; Kaltsides and Dedio, 1970 a,b; Krapovickas et al, 1974; Mabry et al, 1977).

Runemark (1968) aconseja restringir los estudios químicos a los problemas mencionados en último término pero, por otro lado, dice que si el método se maneja con cautela puede, en muchos casos, dar indicaciones acerca de relaciones de considerable interés taxonómico.

El éxito en el estudio de los compuestos fenólicos para la resolución de problemas taxonómicos reside en la existencia de diferencias químicas entre los taxones que se estudian. Si se trabaja con patrones cromatográficos sin identificación de compuestos, se están estudiando fenotipos bioquímicos. La presencia de compuestos químicos marcadores o diagnósticos indicarían la existencia de genes marcadores específicos en la población.

Es de fundamental importancia el estudio de la variación intraespecífica o intrapoblacional de una especie o taxon antes de emprender comparaciones con otros grupos para determinar si las variaciones no son artefactos producidos por factores intrínsecos a la técnica utilizada. Es conveniente analizar la mayor cantidad de individuos posibles de cada grupo e igualar las condiciones experimentales de trabajo. Si es posible, deberían estudiarse algunos individuos más de una vez para observar repetibilidad de resultados. Con un buen estudio de variación intraespecífica resulta sencillo establecer las similitudes y diferencias entre los distintos taxones y mucho más certero el esbozo de las relaciones existentes entre los mismos. Por último, no hay que olvidar que estos datos deberán ser comparados e integrados a estudios morfológicos, citológicos, ecológicos, genéticos, anatómicos y palinológicos para poder, de esta manera, realizar un buen estudio biosistemático del grupo.

En este trabajo se estudiarán los perfiles cromatográficos de las especies del género Bulnesia para determinar las similitudes y diferencias que existen entre ellas. Se incluirán en este estudio los géneros Porlieria y Plectrocarpa con el fin de establecer relaciones en la subfamilia Zygophylloideae. La integración de estos datos con los demás estudios realizados permitirán establecer las relaciones entre las distintas especies del género Bulnesia y sus afinidades con otros géneros de la misma subfamilia.

IV.2.- Métodos

IV.2.a) Técnicas utilizadas

El material recogido en el campo fue secado a 45-50°C durante varios días y guardado en frascos oscuros y herméticos para preservarlo de la luz y de la humedad. Con el propósito de estudiar variabilidad intraespecífica en ningún caso se mezcló material de individuos diferentes.

1.- Extracción

- Se molió 1 gr de hojas secas en mortero o molino. En el caso de realizarlo en mortero se mezcló vidrio molido para facilitar la molienda.
- Para solubilizar los compuestos fenólicos se utilizaron métodos diferentes, con solventes alcohólicos o acuosos dependiendo del material a estudiar. Los fenoles pueden ser extraídos con acetona, etanol, metanol o agua y los compuestos no fenólicos pueden ser extraídos con solventes orgánicos no polares como éter de petróleo, hexano, benceno, cloroformo o éter.

En el género Bulnesia se ensayaron dos técnicas:

- A.- Extracción de 1 gr de hojas secas en metanol 80% 24 horas a temperatura ambiente o 48 horas en heladera (-4°C); filtración con papel y reducción a sequedad del extracto metílico filtrado con evaporador. El residuo sólido fue redissuelto en 1 ml de metanol 100%.
- B.- Se obtuvo el extracto metílico filtrado de la misma manera que lo indica la técnica A. El residuo sólido obtenido por evaporación fue redissuelto en 1 ml de agua destilada. Luego se agregó 5 ml de éter etílico y se dejó decantar algunos minutos al cabo de los cuales se separaron dos fases: el éter en la superior y el extracto acuoso en la inferior. Al principio el éter, cuya principal función es extraer clorofila, grasas y otros compuestos no fenólicos, aparece de un color verde muy oscuro. Repitiendo el proceso varias veces, extrayendo el éter que ha solubilizado compuestos no fenólicos y reemplazándolo con éter nuevo, se logró que la fase superior aparezca límpida. Para asegurarse que la clorofila se ha extraído totalmente se sembró una gota de éter de la fase superior en papel Whatman 3 MM y se observó bajo luz U.V. (3600 Å aprox.). La aparición de color rojizo es índice de que aún hay clorofila e indicó que los lavados con éter debían continuarse aunque la fase superior pareciera límpida a simple vista. El éter proveniente de los lavados se recogió en un recipiente y se guardó para su posterior estudio. Los extractos obtenidos se guardaron en congelador (-10°C) hasta el momento de ser usados.

2.- Separación de compuestos fenólicos

Para separar los compuestos fenólicos se utilizan técnicas cromatográficas. Se han usado una gran variedad de adsorbentes pero el método más importante y más usado para separar mezclas complejas

de productos naturales es la cromatografía bidimensional en papel. También se ha usado, con buenos resultados, cromatografía en capa delgada, cromatografía gaseosa y electroforesis en papel.

En el presente trabajo se ha utilizado cromatografía bidimensional en papel y en capa delgada utilizando poliamida como adsorbente. La metodología seguida en cada caso se expone a continuación.

A.- Cromatografía bidimensional en papel

1) Extractos acuosos

Se utilizó papel Whatman 3 MM para cromatografía, empleándose el método descendente bidimensional. Se sembraron dos papeles de cada individuo, uno con 50 μ y otro con 100 μ para estudiar compuestos que están en alta y baja concentración respectivamente.

Los sistemas de solventes probados fueron:

a - 1er. solvente: 6n-butanol:1 ácido acético:2 agua destilada;

2do. solvente: ácido acético 15%;

b - 1er. solvente: 6 n-butanol:1 ácido acético:2 agua destilada;

2do. solvente: ácido acético 2%;

c - 1er. solvente: 3 ter-butanol:1 ácido acético:1 agua destilada;

2do. solvente: ácido acético 15%;

d - 1er. solvente: 3 ter-butanol:1 ácido acético:1 agua destilada;

2do. solvente: ácido acético 2%;

Se utilizaron los mismos sistemas de solventes para correr extractos previamente pasados por columna de Sephadex.

Los papeles se corrieron en cubas de madera de 57 x 57 x 62 cm previamente saturadas.

2) Extractos etéreos

Se utilizó cromatografía en papel para correr los extractos etéreos obtenidos de los lavados de los extractos acuosos,

utilizando los siguientes solventes:

1º) 3 ter-butanol:1 ácido acético:1 agua destilada;

2º) ácido acético 15%;

B.- Cromatografía bidimensional en capa delgada

Se utilizó como adsorbente poliamida y como soporte placas de vidrio de 20 cm x 20 cm.

1) Sistema de solventes

Se probaron los siguientes:

a - 1er. solvente: 13 agua destilada:3 etanol:3 metil etil cetona:1 acetil acetona;

2do. solvente: 9 cloroformo:4 metanol:2 metil etil cetona;

b - 1er. solvente: 20 cloroformo:10 metanol:5 metil etil cetona:1 acetil acetona;

2do. solvente: 8 metanol:2 agua destilada;

c - 1er. solvente: igual a);

2do. solvente:1 metanol:1 agua destilada;

d - 1er. solvente: igual a);

2do. solvente: ácido acético 15%;

e - 1er. solvente: 3 ter-butanol:1 ácido acético:1 agua destilada;

2do. solvente: ácido acético 15%;

f - 1er. solvente: igual e);

2do. solvente: 8 metanol:2 agua destilada;

g - 1er. solvente: 90 metanol:5 ácido acético:5 agua destilada;

2do. solvente: 8 metanol:2 agua destilada;

h - 1er. solvente: 3 metanol:1 etil acetato;

2do. solvente: metanol 100%;

i - 1er. solvente: 15 metanol:3 etanol:3 metil etil cetona:1 acetil acetona;

2do. solvente: 8 metanol:2 agua destilada;

- j - 1er. solvente: 10 etanol:3 butanona:1 acetil acetona;
2do. solvente: 8 metanol:2 agua destilada;
- k - 1er. solvente: 9 cloroformo:4 metanol:2 metil etil cetona;
2do. solvente: 13 agua destilada:3 etanol:3 metil etil acetona:1 acetil acetona;

3.- Preparación de la poliamida

Se realizaron las siguientes pruebas:

- a) 7,5 gr de poliamida en 40 ml de metanol 100%;
- b) 5 gr de poliamida en 45 ml de 2 partes de cloroformo y 3 partes de metanol;
- c) 5 gr de poliamida en 45 ml de 1 parte de cloroformo:4 partes de metanol;

En cada caso se agitó muy bien a mano o, preferentemente, con agitador magnético.

4.- Preparación del soporte de vidrio

Las placas de vidrio (20x20) cm son lavadas con agua, cepillo y jabón para eliminar partículas de polvo. Luego se ponen en un recipiente con agua y jabón especial para lavado de material de vidrio (en este caso se utilizó la marca De Bernard con muy buenos resultados) y se deja hervir 4-5 hs. Se apaga el fuego y se deja hasta el día siguiente. Se enjuaga muy bien con agua corriente y luego con agua destilada. Secar en estufa a 100°C y usar inmediatamente después que se han enfriado.

5.- Preparación de la placa de poliamida

Se utilizaron dos formas de colocar la poliamida: manual o mecánica. Para distribuir homogéneamente la poliamida en forma mecánica se utilizó una bandeja de plástico con capacidad para 5 placas de 20 x 20 cm sobre la cual se desliza a velocidad constante una pequeña cuba que contiene la poliamida. Como el deslizamiento de la cuba es manual, se requirió un cierto adiestramiento para lograr que las placas sean todas del mismo espesor. La cuba tiene un sistema para regular el espesor de la placa (2μ aprox.). En

forma manual se realizó volcando poliamida sobre la placa de manera de cubrir un cuarto de la misma y luego se efectuaron movimientos rotatorios a fin de que se cubra toda la superficie. El excedente de poliamida se retiró con papel de filtro.

Las placas se sembraron con micropipetas o capilares. Se sembró entre 7λ y 12λ a fin de estudiar compuestos que se encontraron en alta y baja concentración respectivamente. Se corrieron en cubas de vidrio de 25 x 25 x 37 cm con papeles de filtro adheridos a sus caras a fin de mantenerlas saturadas.

6.- Observación de los compuestos fenólicos

Se realizó bajo luz U.V. (3600 \AA aprox.) con y sin exposición a vapores de amoníaco. En cada compuesto se registró su color bajo luz U.V. sin amoníaco y el viraje de color experimentado al ser expuestos al amoníaco.

7.- Documentación de resultados

En todos los casos se realizaron dibujos del cromatograma obtenido.

Trabajando con cromatografía en capa delgada se realizó en algunos casos copias fotostáticas utilizando papel heliográfico: se coloca la poliamida en contacto con el papel bajo luz U.V. y al cabo de varios minutos se revela con vapores de amoníaco el papel impresionado. De esa manera, aparecen los compuestos de color rojo intenso sobre un fondo ligeramente rojizo.

Se realizó fotografía en blanco y negro; la película utilizada fue Ilford Pan F 50 ASA.

IV.2.b) Resultados y discusión de las técnicas empleadas

De los dos métodos de extracción realizados, alcohólico y acuoso, se obtuvieron mejores resultados con la extracción acuosa. Los cromatogramas obtenidos con esta técnica tuvieron mejor resolución que con el extracto alcohólico.

La cromatografía bidimensional en papel no ofreció buena resolución con ninguno de los solventes probados. En todos los casos se observó un conglomerado de manchas con Rf similares en am-

bos solventes y muy difíciles de resolver a simple vista. El problema subsistió aún después de pasar los extractos por columna de Sephadex. Recortando las manchas y eluyéndolas probablemente hubiera sido relativamente sencillo diferenciar e identificar los compuestos, pero dado que la finalidad de este trabajo es utilizar los compuestos fenólicos como un carácter taxonómico, analizando las similitudes de los taxones a través de sus cromatogramas, se descartó la cromatografía en papel y se trabajó con un sistema que ofreció mejor resolución: cromatografía bidimensional en capa delgada utilizando poliamida como adsorbente sobre soporte de vidrio.

Como se indicó anteriormente, se probaron 11 sistemas de solventes de los cuales solamente el primero (a) dió buena resolución en los géneros estudiados. En los demás sistemas se resolvían, a lo sumo, 2 compuestos y resultaba imposible poder obtener cromatogramas que permitieran diferenciar los géneros y especies analizados.

Una vez resuelto el sistema de solventes a utilizar, el principal problema que se presentó es que, si bien la resolución de los compuestos era buena, se producía desprendimiento de la poliamida en el 90% de los casos al ser introducida la placa en el segundo solvente. Esto podría deberse a que las moléculas de poliamida se hidratan con el primer solvente, que contiene una gran proporción de agua; al ser introducidos en el segundo solvente, con gran proporción de cloroformo, se produce una brusca contracción que produce el desprendimiento del adsorbente. Se observó que el desprendimiento comenzaba en las zonas de menor adherencia del adsorbente al soporte (punto de siembra, lugar en que estuvo en contacto con el primer solvente, bordes más gruesos, zonas con imperfecciones como por ejemplo, poliamida poco disuelta). Se trató de resolver el problema tratando de lograr una adherencia máxima entre el soporte y la poliamida, lo que se logró teniendo en consideración los siguientes factores:

- a) limpieza del soporte de vidrio;
 - b) preparación de la poliamida;
 - c) espesor de la placa;
- a) La limpieza de las placas para eliminar grasas y partículas de polvo se realizó como se indicó en las técnicas. Es muy importante colocar la poliamida sobre las placas inmediatamente de secadas en estufa, quizás la humedad ambiente afecte el soporte disminuyendo la adherencia de la poliamida.
- b) Para preparar la poliamida se probaron tres modos diferentes, la que mejor resultado dió fue: 5 gr de poliamida en 45 ml de una parte de cloroformo y 4 partes de metanol 100%. Es imprescindible agitar la poliamida de manera que no queden granulaciones, ya que éstas constituirían puntos de debilidad donde comenzaría el descascaramiento.
- c) El espesor de la capa de poliamida fue de 1,5 - 2 μ . Si es mayor es probable que se produzca desprendimiento y si es menor hay mala resolución de los compuestos.

El hallazgo de una técnica como la mencionada que permita la utilización de cloroformo como segundo solvente en cromatografía bidimensional en capa delgada utilizando poliamida industrial como adsorbente, sin que se produzca desprendimiento de la misma, es de fundamental importancia ya que éste es un problema que se ha presentado reiteradamente en otros laboratorios (Dr. Seigler, comunicación verbal).

IV.3.- Resultados

Se encontraron en el género aproximadamente 34 compuestos que se diferencian entre sí por su posición relativa, color en U. V. y el viraje de color que experimentan al ser expuestos a vapores de amoníaco bajo luz ultravioleta. Los compuestos se han denominado con números y letras; los primeros señalan los compuestos que se encuentran en todos los individuos estudiados de una especie, o por lo menos, en más del 75% de ellos; las letras indican compuestos que si bien a veces son típicos de la especie estudiada se encuentran sólo en algunos individuos de la población. En la Tabla 2 se indican los colores de los compuestos observados bajo la luz U.V. y el viraje que experimentan al ser expuestos a vapores de amoníaco.

Las diferentes gradaciones de concentración del compuesto en el extracto acuoso: muy concentrado, concentración mediana y concentración relativamente leve, se indican con los signos +++, ++ y +, respectivamente. La letra t indica que sólo hay trazas del compuesto a la concentración sembrada. Los asteriscos en la parte superior derecha indican el número de veces que se ha repetido cada cromatograma, sembrando extractos diferentes, o un mismo extracto en distintas concentraciones.

En las placas se corrió, simultáneamente con el extracto obtenido, un flavonoide cuya estructura se conoce: rutina. En todos los casos la mancha 1 coincidió con rutina en cuanto al color en U.V. con y sin exposición a vapores de amoníaco, y los Rf en el 1er. y el 2do. solvente fueron similares, por lo tanto, es altamente probable que 1 sea rutina.

Los resultados que se enuncian a continuación se obtuvieron con cromatografía en capa delgada utilizando poliamida como adsorbente; como ya se ha mencionado la cromatografía en papel no ofreció buena resolución.

En las figs. 5-8 se muestran fotografías de los espectros fenólicos de un individuo de cada especie con su correspondiente interpretación gráfica. Como las fotografías son en blanco y negro, las referencias de color con y sin exposición a vapores de amoníaco deberán tomarse de la Tabla 2.

La fig. 9 representa en forma esquemática los cromatogramas de las siete especies estudiadas. Se señala con línea llena los compuestos que están presentes en todos los individuos estudiados y que pueden considerarse, con seguridad, como compuestos indicadores de la especie representada; con línea de puntos se señalan los compuestos que representarían la variación intraespecífica hallada en los individuos estudiados para dicha especie.

En B. foliosa todos los individuos presentan los compuestos 1,2 y 3, estando 1 en muy alta concentración y 2 y 3 en mediana concentración con respecto a 1; 7 individuos presentan el compuesto a exclusivamente, uno presenta a,b y c y dos tienen b y c (Tabla 3).

En B. arborea se estudiaron dos linajes, uno en Colombia y otro en Venezuela. Ambos poseen los compuestos 1,2,3 y 5 en todos los individuos; 4 aparece en el 80% de los individuos estudiados del linaje de Venezuela y en el 100% de los individuos estudiados del de Colombia (Tablas 4 y 5). En la mayoría de los individuos de Venezuela 2 aparece en menor concentración que en Colombia, siendo en algunos casos difícil determinar su presencia. Los compuestos e,o y p se presentan en menos del 75% de los individuos estudiados. En los individuos 9035 y 9041 aparece o en alta concentración y 5 en baja concentración con respecto a los demás individuos estudiados.

B. carrapo presenta cuatro compuestos: 1,2,3 y 6 en alta concentración el primero y mediana concentración los otros tres. En el individuo 9622 se observa en los dos cromatogramas analizados una discrepancia con los demás individuos estudiados en cuan-

to a la concentración de los compuestos 1 y 6, ya que éste último es más concentrado que el primero, situación inversa al caso más general que se da en la especie (Tabla 6). Se determinó la presencia de 1 realizando cromatografía superpuesta de B. carrapo con B. foliosa.

B. bonariensis posee 4 compuestos en todos los individuos estudiados: 1,2,6 y 7; además, 4 individuos tienen el compuesto a, tres el compuesto d y uno los compuestos a y d (Tabla 7).

En B. schickendantzii se estudiaron cuatro individuos, tres de ellos poseen los compuestos 1,2,3,7,8 y 9, faltando este último en el individuo restante. Uno de los individuos posee además f y g y dos f solamente; el individuo restante no posee estos compuestos (Tabla 8).

B. retama posee hojas sólo en las ramas muy jóvenes y es muy difícil hallarlas en la floración (Descole et al, 1940), por lo que se han realizado extractos moliendo tallos verdes delgados en 15 individuos coleccionados. Además, se estudiaron compuestos fenólicos en hojas de dos individuos jóvenes. En los 15 individuos en los que se utilizaron los tallos se observaron los compuestos 10,11 y 12; el 13 estuvo ausente sólo en uno de ellos; 5 individuos poseerían el compuesto h y uno los compuestos h y i. Los individuos en los cuales se estudiaron compuestos con extracto de hojas (Cult. Nº 423 y Cult. Nº 408) poseerían también los compuestos 10, 11 y 12; 13 estaría ausente. Uno de ellos presenta el compuesto h y ambos tendrían un nuevo compuesto j en concentración regular (Tabla 9).

B. sarmientoi presenta seis compuestos típicos de la especie en el total de individuos estudiados: 3,14,15,16,17 y 18. El compuesto 17 se encuentra en muy baja concentración, observándose rastros en la mayoría de los individuos estudiados. Los compuestos k, l, m y n se presentan en menos del 100% de los individuos estudiados y se encuentran distribuidos según lo indica la Tabla 10.

Con los extractos etéreos obtenidos del lavado del extracto acuoso se obtuvieron los siguientes resultados mediante cromatografía bidimensional en papel: en todos los individuos estudiados de B. foliosa aparece un compuesto amarillo intenso, probablemente una aglicona, que migra sólo en la dirección del primer solvente; con amoníaco vira a un amarillo muy intenso. En B. schickendantzii apareció en algunos individuos un compuesto con las mismas características que las mencionadas para B. foliosa; en B. retama aparece un compuesto amarillo verdoso que no vira con amoníaco y que migra muy poco en la dirección del segundo solvente. En todos los casos aparecen fenoles celestes y violetas y, en algunos individuos, compuestos decolor pardo que pertenecerían al extracto acuoso y que habrían pasado al extracto etéreo durante el proceso de lavado.

Los datos que se obtuvieron por cromatografía bidimensional en papel de los extractos etéreos no se tuvieron en cuenta para la confección de los cromatogramas patrones dado que no permiten establecer diferencias significativas entre las especies estudiadas.

Plectrocarpa tetracantha posee, con los sistemas de solventes utilizados en Bulnesia, los compuestos: 1,2,3,21,22 y 23 (Tablas 11,13; fig. 10). Los compuestos 1,2 y 3 coinciden en cuanto a posición relativa y color con y sin exposición a vapores de amoníaco con los denominados con el mismo número en el género Bulnesia.

Porlieria microphylla posee los compuestos 1,2,3,21 y 24 en todos los individuos estudiados (Tablas 12,14; fig. 10). Los compuestos 1,2 y 3 serían los mismos que se estudiaron en las especies del género Bulnesia y en Plectrocarpa tetracantha.

En Porlieria chilensis se ha estudiado un único individuo en ejemplar de herbario. Se observó con claridad los compuestos 1, 2 y 3 no resultando clara la presencia de 21 y 24 debido a la existencia de fenoles celestes que dificultan la visualización de los mismos.

La cromatografía de compuestos fenólicos en el género Larrea ha sido ampliamente estudiada por Mabry et al (1977) pero se han realizado unas pocas cromatografías con la finalidad de determinar, con el método de capa delgada y el sistema de solventes utilizados en este trabajo, si posee algunos de los compuestos caracterizados para los géneros Bulnesia, Porlieria y Plectrocarpa. En L. divaricata y L. ameghinoi se determinó la presencia de los compuestos 1,2 y 3. En L. cuneifolia resultó clara la presencia del compuesto 3 y en L. nitida se observaron con claridad 1 y 3. En todas las especies de Larrea se observaron compuestos característicos de cada una de ellas pero que no se encontraron en los géneros estudiados en este trabajo.

Variando levemente las condiciones del primer solvente, reduciendo a la mitad la cantidad de acetyl acetona, se detectaron los compuestos mencionados en las condiciones anteriores y dos compuestos pardos adicionales 19 y 20 (con exposición a vapores de amoníaco el primero vira a pardo anaranjado y el segundo a amarillo), en cinco de los seis individuos estudiados de Plectrocarpa tetraantha y en dos individuos de Porlieria microphylla (fig. 11). Además, el compuesto 1 parecería constar de, por lo menos, dos compuestos. Dicha modificación al primer solvente deberá ser tomada en cuenta en estudios futuros en los que se realicen comparaciones de los perfiles cromatográficos de las especies de los géneros Porlieria y Plectrocarpa.

TABLA 2.- Reacciones de color en los compuestos fenólicos del género Bulnesia.

Compuesto	Color en U.V.	Color en U.V. con amoníaco
1	Pardo	Pardo anaranjado
2	"	Pardo
3	"	Amarillo brillante
4	"	Pardo anaranjado claro
5	"	Pardo anaranjado
6	"	Pardo
7	"	Pardo anaranjado más oscuro que 1
8	"	Amarillo
9	"	Pardo
10	"	Amarillo brillante
11	"	Amarillo muy brillante
12	"	Pardo anaranjado claro
13	"	Pardo anaranjado claro
14	"	Pardo anaranjado oscuro
15	"	Pardo anaranjado claro
16	"	Amarillo oro
17	"	Pardo anaranjado
18	"	Pardo anaranjado
a	"	Pardo
b	"	Pardo anaranjado
c	"	Pardo anaranjado
d	"	Amarillo
e	"	Amarillo
f	"	Amarillo
g	"	Pardo
h	"	Pardo anaranjado
i	"	Pardo anaranjado
j	"	Pardo
k	"	Pardo
l	"	Pardo
m	"	Pardo anaranjado claro
n	"	Pardo anaranjado
o	"	Pardo
p	"	Pardo anaranjado

TABLA 3.- Compuestos fenólicos en B. foliosa.

Número de herbario	C o m p u e s t o s					
	1	2	3	a	b	c
9126	+++	++	++	-	-	-
9127	+++	++	++	-	-	-
9129 *	+++	++	++	+	-	-
9133 *	+++	++	++	+	+	+
9135 *	+++	++	++	+	-	-
9144 *	+++	++	++	t	t	t
9146	+++	++	++	-	-	-
9147	+++	++	++	+	-	-
9150	+++	++	++	+	-	-
9159	+++	++	++	-	-	-
9163	+++	++	++	-	t	t
9491 *	+++	++	++	+	-	-
9593	+++	++	++	-	-	-
9124	+++	++	++	t	-	-
9621 *	+++	++	++	t	-	-

TABLA 4.- Compuestos fenólicos en B. arborea (Colombia).

Número de herbario	C o m p u e s t o s					e	o	p
	1	2	3	4	5			
9609	++	++	++	+	+++	-	-	-
9611 *	++	++	++	++	+++	-	-	-
9476 *	++	++	++	++	+++	-	-	-
9477	+	++	++	++	+++	-	-	-
9479 *	++	++	++	++	+++	t	-	-
9480 *	++	++	++	++	+++	+	t	t
9481 ****	++	++	++	++	+++	+	t	-

TABLA 5.- Compuestos fenólicos en B. arborea (Venezuela)

Número de herbario	C o m p u e s t o s							
	1	2	3	4	5	e	o	p
9033	+	++	++	-	-	-	+	-
9035	++	++	++	-	t	-	++	-
9037	+++	+	+++	t	+++	-	-	-
9038	+++	t	+++	++	+++	-	-	-
9039	+++	++	+++	++	+++	-	-	-
9040	+++	+	+++	+	+++	-	-	-
9041	+++	++	+++	t	t	-	++	-
9042	+++	++	+++	-	+++	t	+	+
7311 (642-a)	+++	++	++	++	++	-	-	-
7311 (642-b)	+++	++	++	++	++	-	-	-
7311 (642-c)	+++	t	+++	+	++	-	-	-

TABLA 6.- Compuestos fenólicos en B. carrapo

Número de herbario	Compuestos			
	1	2	3	6
9618	+++	++	++	++
9622 *	++	++	++	+++
9449-1	+++	++	++	++
9449-2 *	+++	++	++	++
9449-3 *	++	+++	++	++
9449-4	+++	++	++	++
9449-5	+++	++	++	++
9449-6	+++	++	++	++
9449-7	+++	++	++	++

TABLA 7.- Compuestos fenólicos en B. bonariensis

Número de herbario	C o m p u e s t o s					
	1	2	6	7	a	d
9046*	+++	++	++	++	+	t
9048	+++	++	++	++	-	t
9490	+++	++	++	++	-	t
9134	+++	++	++	++	+	-
9142*	+++	++	++	++	-	-
9153	+++	++	++	++	+	-
9154*	+++	++	++	++	-	-
9205	+++	++	++	++	-	t
9206*	+++	++	++	++	+	-
9211*	+++	++	++	++	+	-

TABLA 8.- Compuestos fenólicos en B. schickendantzii

Número de herbario	C o m p u e s t o s							
	1	2	3	7	8	9	f	g
9024***	+++	++	++	+	+	t	+	+
9188**	+++	++	++	++	+	+	t	-
9195	+++	++	++	++	t	t	t	-
9558	+++	++	++	t	t	-	-	-

TABLA 9.- Compuestos fenólicos en B. retama

Número de herbario o cultivo	C o m p u e s t o s						
	10	11	12	13	h	i	j
9059*	++	+++	+++	+	+	-	-
9061	++	+++	+++	+	-	-	-
9066	++	+++	+++	+	-	-	-
9069*	++	+++	+++	+	t	-	-
9099	++	+++	+++	+	t	-	-
9084	++	+++	+++	+	-	-	-
9092	++	+++	+++	+	-	-	-
9103	++	+++	+++	+	-	-	-
9113*	++	+++	+++	-	-	-	-
9139	++	+++	+++	+	t	-	-
9152*	++	+++	+++	t	t	-	-
9157*	++	+++	+++	+	-	-	-
9192***	++	+++	+++	+	-	-	-
9088	++	+++	+++	+	-	-	-
9576	++	+++	+++	+	t	+	-
Cult. Nº 408-1	++	+++	+++	-	-	-	+
Cult. Nº 423***	++	+++	+++	-	t	-	+

TABLA 10.- Compuestos fenólicos en B. sarmientoi

Número de herbario	C o m p u e s t o s									
	3	14	15	16	17	18	k	l	m	n
471*	+++	+++	+++	t	+	t	t	t	-	-
9212	+++	++	++	t	+	+	-	-	+	-
9214	+++	+++	++	+	t	t	-	-	+	-
9216	+++	++	++	+	t	-	-	-	-	-
9217*	+++	++	++	t	t	+	+	-	+	t
9219	+++	++	+	+	+	+	t	-	+	-
9220	+++	++	++	t	+	+	+	+	-	+
9223	+++	++	++	+	t	+	t	t	+	t
9222	+++	++	++	t	+	++	t	t	-	-

TABLA 11.- Compuestos fenólicos en Plectrocarpa tetraacantha

Número de herbario o cultivo	C o m p u e s t o s					
	1	2	3	21	22	23
9097	+++	++	++	++	+	+
Cult. N ^o 409-4	+++	++	++	++	+	+
Cult. N ^o 409-3	+++	+	++	++	+	+
Cult. N ^o 409-6	+++	++	++	++	+	+
Cult. N ^o 409-2	+++	++	++	++	+	+
Cult. N ^o 409-1	+++	++	++	++	+	t

TABLA 12.- Compuestos fenólicos en Porlieria microphylla

Número de herbario o cultivo	C o m p u e s t o s				
	1	2	3	21	24
9201	+++	++	++	++	++
Cult. N ^o 410-3	+++	++	++	++	++
Cult. N ^o 410-1	+++	++	++	++	++
Cult. N ^o 410-4	+++	++	++	++	++
Cult. N ^o 410-5	+++	++	++	++	++
Cult. N ^o 410-6	+++	++	++	++	++

TABLA 13.- Reacciones de color de los compuestos fenólicos en Plectrocarpa tetraacantha.

Compuesto	Color en U.V.	Color en U.V. con amoníaco
1	Pardo	Pardo anaranjado
2	"	Pardo
3	"	Amarillo brillante
21	"	Pardo anaranjado oscuro
22	"	Pardo
23	"	Pardo amarillento

TABLA 14.- Reacciones de color en los compuestos fenólicos en Porlieria microphylla

Compuesto	Color en U.V.	Color en U.V. con amoníaco
1	Pardo	Pardo anaranjado
2	"	Pardo
3	"	Amarillo brillante
21	"	Pardo anaranjado oscuro
24	"	Pardo anaranjado

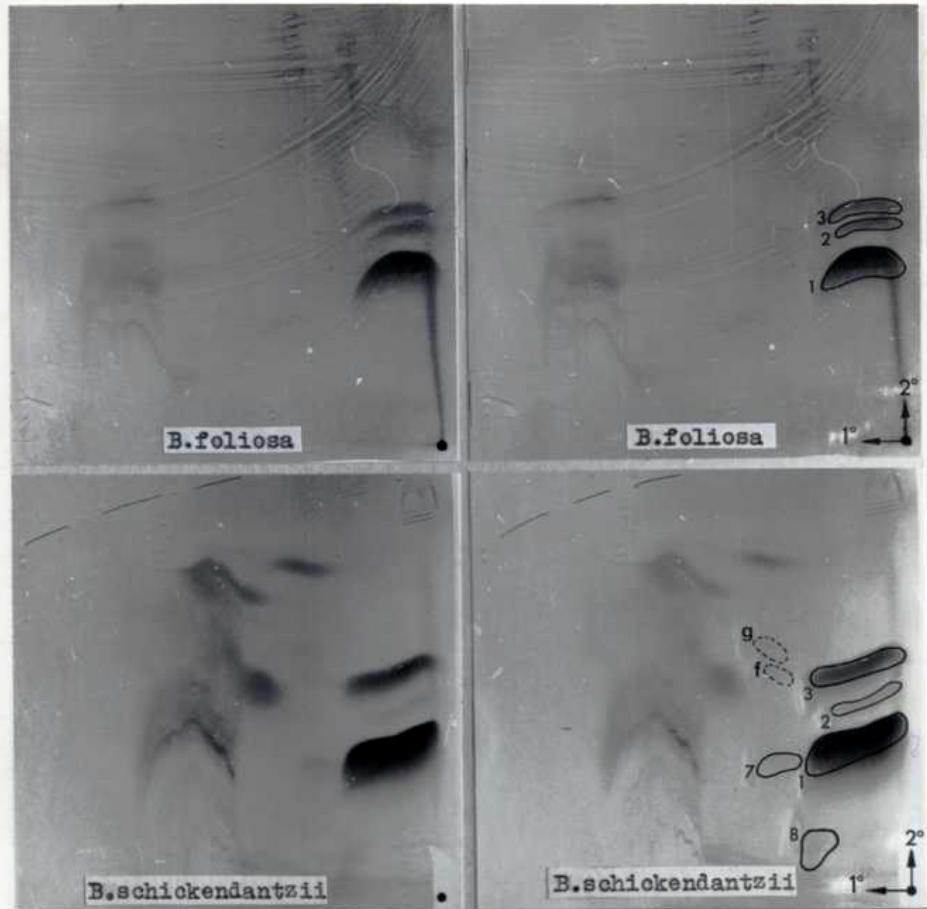


Figura 5.- Fotografías de placas cromatográficas donde se visualizan compuestos fenólicos expuestos a vapores de amoníaco en *B. foliosa* y *B. schickendantzii*. A la derecha se señalan y numeran el origen de siembra y la dirección de corrida del primero y segundo solvente.



Figura 6.- Fotografías de placas cromatográficas donde se visualizan compuestos fenólicos expuestos a vapores de amoníaco en *B. arborea* y *B. carrapo*. A la derecha se señalan y numeran el origen de siembra y la dirección de corrida del primero y segundo solvente.

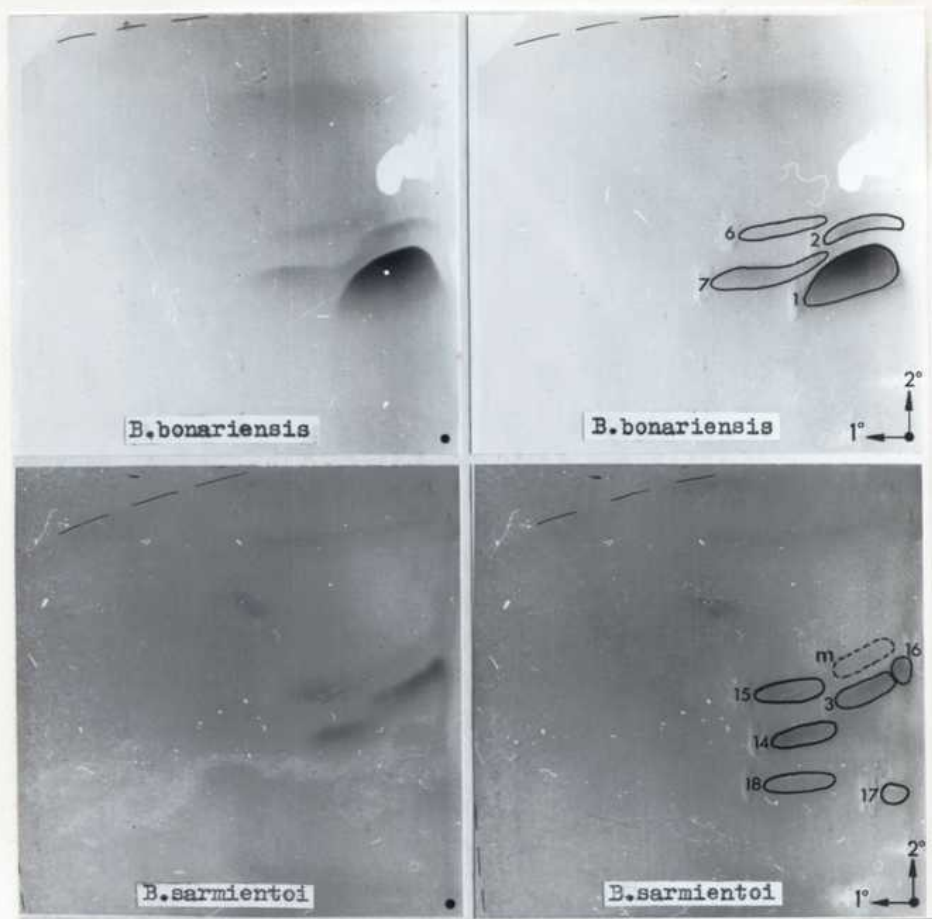


Figura 7.- Fotografías de placas cromatográficas donde se visualizan compuestos fenólicos expuestos a vapores de amoníaco en B. bonariensis y B. sarmientoi. A la derecha se señalan y numeran el origen de siembra y la dirección de corrida del primero y segundo solvente.

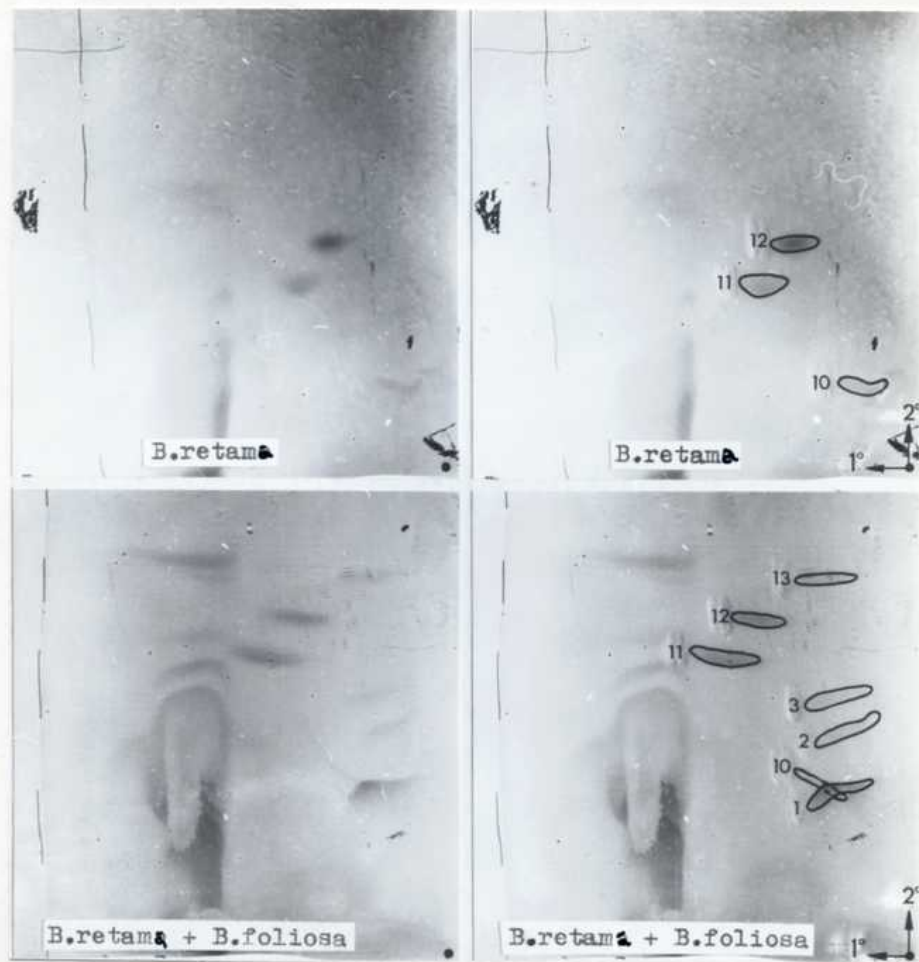


Figura 8.- Fotografías de placas cromatográficas donde se visualizan compuestos fenólicos expuestos a vapores de amoníaco en B. retama y en el cromatograma superpuesto de B. retama + B. foliosa. A la derecha se señalan y numeran el origen de siembra y la dirección de corrida del primero y segundo solvente.

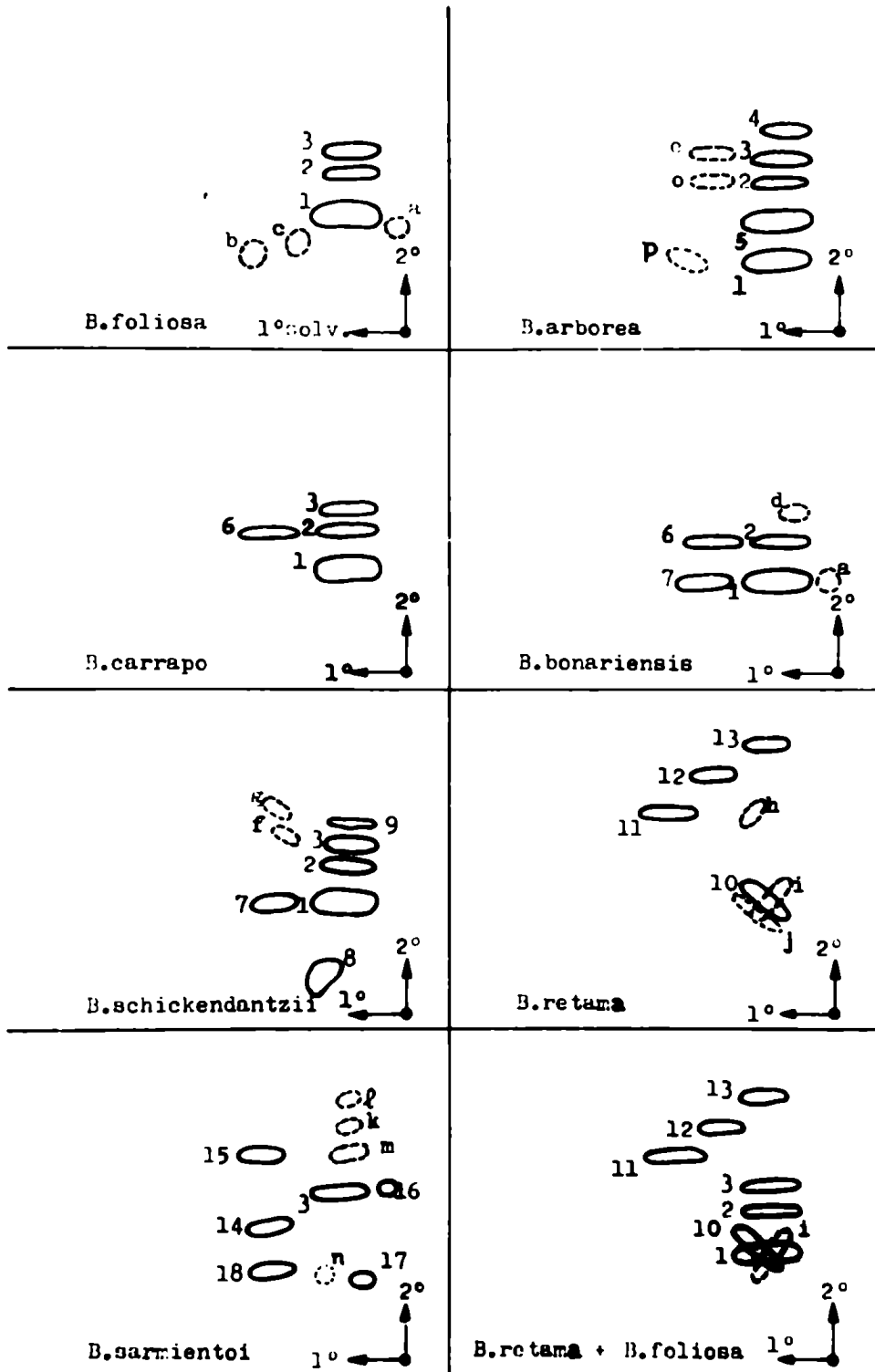


Figura 9.- Representación esquemática de los cromatogramas en el género Bulnesia (ver explicación en el texto).

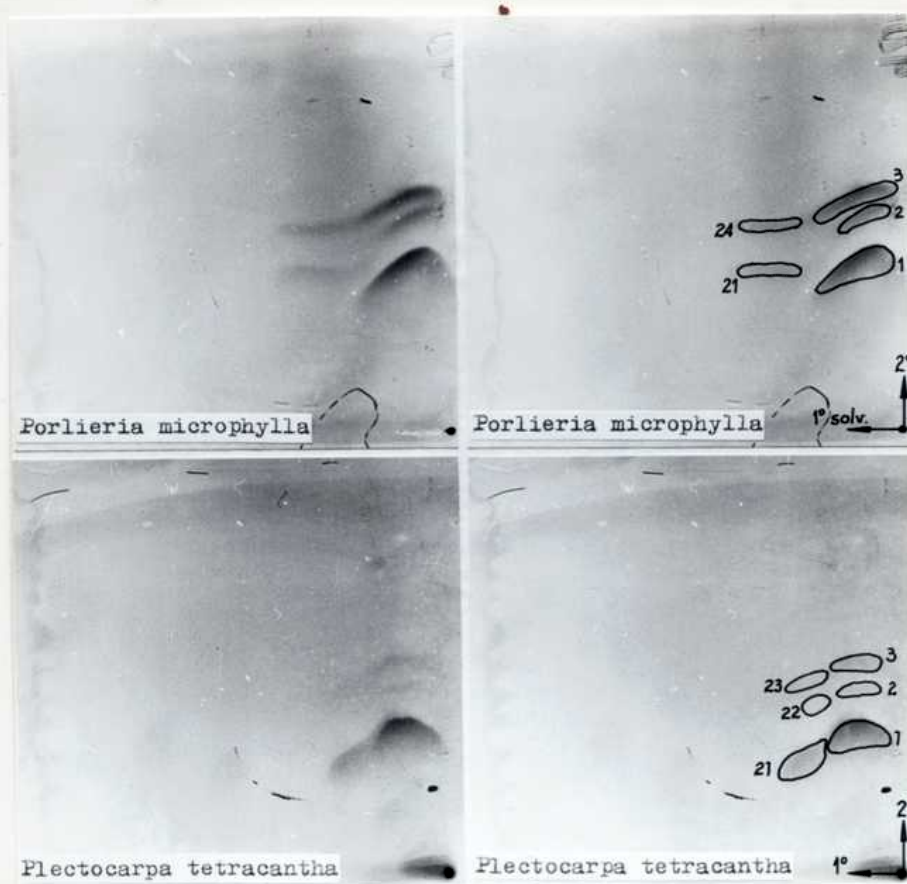


Figura 10.- Fotografías de placas cromatográficas donde se visualizan compuestos fenólicos expuestos a vapores de amoníaco en Porlieria microphylla y Plectocarpa tetracantha. A la derecha se señalan y numeran el origen de siembra y la dirección de corrida del primero y segundo solvente.

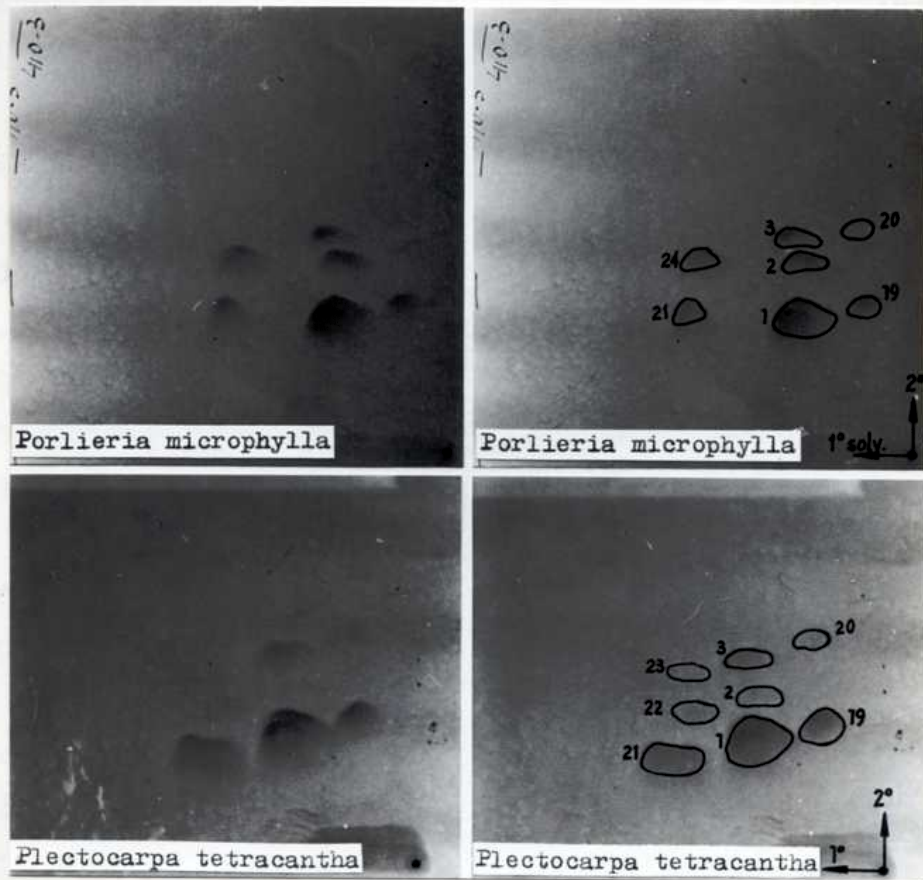


Figura 11.- Fotografías de placas cromatográficas donde se visualizan compuestos fenólicos expuestos a vapores de amoníaco en Porlieria microphylla y Plectocarpa tetraacantha (primer solvente modificado, ver texto). A la derecha se señalan y numeran el origen de siembra y la dirección de corrida del primero y segundo solvente.

V.- TAXONOMIA NUMERICA EN BULNESIA
EN BASE A COMPUESTOS FENOLICOS

V.1.- Introducción

El campo de la morfología comparada y de la sistemática ha sido orientado filogenéticamente bajo la influencia de los evolucionistas; muchos sistemáticos consideraron una "clasificación natural" como sinónimo de "clasificación filogenética".

No es posible establecer taxones naturales en base a filogenia, salvo en los casos en que se conozca el registro fósil completo del grupo. Tampoco es lógico establecer una filogenia definitiva en base a una clasificación natural tentativa (Sokal and Sneath, 1963).

Dado que una verdadera clasificación filogenética no es posible de obtener en la mayoría de los casos, una clasificación natural sería la que contendría la mayor información del grupo estudiado, ya que cuando los miembros de un grupo comparten muchos atributos correlacionados el contenido de información es muy elevado (Sneath and Sokal, 1973).

Sokal y Sneath (1963) definen taxonomía numérica como la "evaluación numérica de la afinidad o similitud entre unidades taxonómicas y el ordenamiento de estas unidades en taxones en base a sus afinidades", o "agrupación por métodos numéricos de unidades taxonómicas en taxones en base a sus estados de caracteres" (Sneath and Sokal, 1973), es decir que, asignando valores numéricos al grado de similitud entre unidades taxonómicas se construyen clasificaciones basadas en estos valores de similitud.

La actitud básica de la taxonomía numérica es una estricta separación entre especulaciones filogenéticas y procedimiento taxonómico. Las relaciones taxonómicas entre taxa son evaluadas en base a las semejanzas que existen en la actualidad. Es una relación

estática o fenética. Hasta que no existan métodos que cuantifiquen la significación filogenética de la similitud o diferencia de los caracteres, esta información es incompatible con la objetividad y repetibilidad que debe tener el proceso taxonómico. Actualmente, se establecen las semejanzas fenéticas (semejanzas basadas en una serie de características fenotípicas) de las entidades taxonómicas y la clasificación se basa sólo en esta información. Por supuesto que pueden hacerse inferencias filogenéticas en base a la clasificación fenética pero no estarían involucradas en el proceso clasificatorio. Sokal y Sneath (1963) y Sneath y Sokal (1973) afirman que sólo la evidencia fenética puede ser usada para establecer clasificaciones satisfactorias, dado el escaso registro fósil ya mencionado y al hecho de que el criterio de elección de formas ancestrales en una filogenia está basado, principalmente, en relaciones fenéticas entre el probable antecesor y sus descendientes.

Desde el advenimiento de la taxonomía numérica se han publicado un gran número de artículos acerca de clasificación basados en caracteres morfológicos, entre otros podrían citarse Hsiao (1973) en el género Platanus; Heiser et al (1965) en especies e híbridos del género Solanum; Morishima (1969) en el género Oryza, et cetera.

Estos métodos también han sido utilizados por varios investigadores en la presentación de datos bioquímicos: Parups et al (1966) en los flavonoides de varias especies del género Trifolium; Stone, Adrouny y Flake (1969) en los aceites de Carya; Adams y Turner (1970) en los terpenos de una población de Juniperus ashei; Adams (1972) en terpenos de Juniperus pinchotii; Hsiao (1973) en los flavonoides del género Platanus; etc.

En el presente trabajo se aplicarán técnicas de taxonomía numérica para determinar las relaciones fenéticas existentes entre las siete especies estudiadas del género Bulnesia, en base al resultado obtenido del estudio de sus compuestos fenólicos. Los resul-

tados de este estudio numérico serán utilizados, conjuntamente con otros datos, para la elaboración de consideraciones sistemáticas del género.

V.2.- Material y Método

El nivel de las unidades taxonómicas empleadas en estudios numéricos puede ser muy variable (individual, poblacional, específico, genérico, etc.), se las denomina "unidades operaciones taxonómicas" (OTU's) dependiendo en cada caso particular el nivel de cada OTU.

El número total de OTU's fue siete, representando cada uno una especie diferente del género Bulnesia. La matriz básica de datos (matriz 1) se confeccionó con los siete OTU's y los dieciocho estados de caracteres, señalando en cada caso los compuestos presentes (1) o no detectados (0) del carácter estudiado. Los caracteres que se han seleccionado para efectuar este estudio numérico corresponden a los compuestos fenólicos estudiados en la sección IV y que son marcadores o diagnósticos de cada especie, descartando los que representan variabilidad intraespecífica. El número de individuos estudiados para cada OTU está indicado en las Tablas 2,3, 4,5,6 de la Sección IV.

Basándose en la matriz básica de datos (Matriz 1) se hallaron, en primer lugar, valores numéricos que representaron el grado de similitud entre cada par posible de los 7 OTU's; estos índices son denominados "coeficientes de similitud". Se construyeron matrices de similitud utilizando tres coeficientes de asociación distintos: a) Jaccard; b) "simple matching coefficient"; y c) Rogers y Tanimoto (Matrices 26, 2 y 14).

A partir de las semejanzas encontradas entre las unidades operacionales taxonómicas se agrupan los OTU's. Para ello se han propuesto una serie de métodos matemáticos de agrupación, ninguno de los cuales tiene validez universal (Sokal y Sneath, 1963; Sneath

y Sokal, 1973), por lo que se utilizan varios de ellos a fin de mi nimizar los defectos de las técnicas y luego se comparan los resultados obtenidos tratando de determinar las coincidencias. Dichas coincidencias valorizan las conclusiones dado que son relativamente independientes de los métodos usados (Petriella y Crisci, 1975).

En el presente trabajo se utilizaron varios métodos para efectuar el agrupamiento ("clustering") de los OTU's estudiados: Método de las variables pesadas (WVGM), Método de los pares pesados (WPGM), Método de las variables no pesadas (UWVGM), Método de los pares no pesados (UWPGM), Método de los pares no pesados usando medias aritméticas (UPGMA) y "Completo". En cada uno de estos métodos se aplicaron los tres coeficientes de asociación mencionados. Se desarrollaron también los métodos UPGMA y Completo utilizando el coeficiente de correlación del momento producto de Pearson y el coeficiente de distancia denominado "Taxonomic distance". En estos dos últimos casos se incluyeron todos los fenólicos estudiados, inclusive aquellos que pueden o no estar presentes en una especie determinada y que representan la variabilidad intraespecífica.

El procesamiento de los datos se realizó en forma manual en el desarrollo de los métodos "UPGM", "UVGM", "UWVGM", "UWPGM" y para los métodos "UPGMA" y "Completo" se utilizó una computadora IBM 360/50 del CESPI (Centro de Estudios Superiores de Procesamiento de la Información en la Universidad Nacional de La Plata). Se utilizaron los programas NT-SYS "System of Multivariate Computer Programs" diseñados por F.S. Rohlf, J.L.P. Kishpaugh y D. Kirk (1971). El desarrollo manual de los métodos resulta sumamente laborioso e insume mucho tiempo en relación al resultado obtenido a través de la computadora pero en este caso la matriz básica de datos no era muy extensa y resultó factible su resolución manual. Se consideró interesante realizarlo de esa manera a fin de conocer el método en sus pasos intermedios, lo cual facilitó la interpretación de los resultados obtenidos posteriormente a través de la computadora.

La representación más común y conveniente de los resultados de taxonomía numérica es mediante la confección de fenogramas. Estos esquemas se asemejan a un árbol filogenético pero están basados exclusivamente en evidencias fenéticas.

Posteriormente, con el fin de medir el grado de distorsión entre los valores de similitud del fenograma obtenido y los de la matriz de similitud original se construye una nueva matriz de distancias a partir del fenograma y luego se aplica un coeficiente de correlación del momento-producto entre la matriz original y la producida por el fenograma. Este coeficiente se denomina "coeficiente de correlación cofenético"; generalmente se ha encontrado que varía entre 0.6 a 0.95 (Sneath y Sokal, 1973); los valores superiores a 0.8 indican escasa distorsión entre ambas matrices (Petriella y Crisci, 1975). Se aplicó coeficiente de correlación cofenético a los fenogramas resultantes de los métodos "UPGMA" y "Completo".

V.3.- Coefficientes de similitud

La similitud entre dos OTU's se estima, generalmente, por medio de coeficientes de similitud que cuantifican la semejanza entre los elementos en las dos columnas de la matriz de datos que representan los estados de caracteres de los dos OTU's en cuestión. Por razones prácticas, se establecen cuatro tipos de coeficientes de similitud: 1) coeficientes de asociación, 2) coeficientes de correlación, 3) coeficientes de distancia y 4) coeficientes probabilísticos (Sneath y Sokal, 1973). En este trabajo se han utilizado coeficientes de los tipos 1, 2 y 3.

1) Coeficientes de asociación

a.- Coefficiente de Jaccard

En este coeficiente se toma en cuenta los siguientes valores:

a: estado del carácter presente en ambos OTU's comparados;

b: estado del carácter presente en el primer OTU pero no en el segundo;

c: estado del carácter presente en el segundo OTU pero no en el primero;

d: estado del carácter ausente en ambos OTU's.

El coeficiente de Jaccard es

$$S_j = \frac{a}{a + b + c}$$

En este coeficiente no se considera la ausencia de un estado de un carácter en ambos OTU's como una medida de similitud. Este coeficiente varía entre 0 y 1, siendo 1 el máximo de similitud consigo mismo.

b.- Simple "Matching coefficient"

Este coeficiente es equivalente al de Jaccard mencionado anteriormente, pero incluye los estado negativos.

$$S_{sM} = \frac{a + d}{a + b + c + d}$$

Teniendo a, b, c y d el significado expresado en el desarrollo del coeficiente de Jaccard.

Varía entre 0 y 1, siendo 1 el valor máximo de similitud.

c.- Coefficiente de Rogers y Tanimoto

Este coeficiente fue definido por Rogers y Tanimoto como

$$S_{RT} = \frac{a + d}{(a + 2b + 2c + d)}$$

Varía entre 0 y 1, siendo 1 el valor máximo de similitud.

Incluye estados negativos, al igual que el "simple matching coefficient".

2) Coeficientes de correlación

El coeficiente de correlación del momento-producto de Pearson es uno de los coeficientes de similitud más utilizados. El coeficiente computado entre los OTU's j y k es (Sneath y Sokal, 1973)

$$r_{jk} = \frac{\sum_{i=1}^n (X_{ij} - \bar{X}_j) (X_{ik} - \bar{X}_k)}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (X_{ij} - \bar{X}_j)^2 \sum_{i=1}^n (X_{ik} - \bar{X}_k)^2}}$$

donde X_{ij} es el valor del carácter i en el OTU j , \bar{X}_j es la media de todos los valores para el OTU j y n es el número total de caracteres. Este coeficiente varía entre $+1$ y -1 y puede utilizarse con más de dos estados para cada carácter.

3) Coeficiente de distancia

Se utilizó el denominado "Taxonomic distance" ("Average Euclidean distance").

La fórmula utilizada para hallar la distancia Δ_{jk} entre los OTU's j y k es

$$\Delta_{jk} = \left[\sum_{i=1}^n (X_{ij} - X_{ik})^2 \right]^{1/2}$$

siendo X_{ij} el valor del carácter i en el OTU j y n el número de caracteres (Sneath and Sokal, 1973).

V.4.- Desarrollo manual de los métodos

Para efectuar el agrupamiento ("clustering") de los OTU's estudiados se usarán los distintos métodos mencionados en V.2.-, siguiendo las pautas indicadas por Sokal y Sneath (1963).

En cada método se utilizarán los valores obtenidos mediante los tres coeficientes de asociación mencionados (Jaccard, simple matching y Rogers y Tanimoto). Como resultado de este procesamiento se obtendrán fenogramas para evidenciar las relaciones entre las especies estudiadas del género Bulnesia.

1) Procesamiento de datos utilizando el "simple matching coefficient".

a) Método de las variables pesadas (Weighted variable-group method)

En la matriz 2 se representan los coeficientes de similitud

entre los 7 OTU's estudiados utilizando el "simple matching coefficient". El primer paso es encontrar la asociación mutua más alta, o sea, una asociación entre dos OTU's mayor que la asociación de estos OTU's con cualquier otro OTU. Para facilitar el trabajo cuando se hace en forma manual es conveniente representar los coeficientes de similitud en forma simétrica. Subrayamos la asociación más alta en cada columna. Observamos que el OTU 1 está correlacionado a un nivel 0.944 con respecto al OTU 3 y que la mayor asociación de 3 es también con 1. Por lo tanto, la asociación entre 1 y 3 es la asociación mutua mayor y 1 y 3 podrían formar un agrupamiento ("cluster"). Vemos que el OTU 4 tiene la mayor correlación con el OTU 1 pero el 1 está más correlacionado con 3 que con 4, por lo tanto 4 no inicia ningún agrupamiento.

Como conclusión del primer ciclo de agrupamiento hallamos los siguientes grupos: 1+3, 2, 4, 5, 6 y 7.

Se puede determinar si los OTU's 2, 4, 5, 6 y 7 pueden participar del grupo 1+3 ya establecido. Siguiendo el criterio de Sokal y Michener (1958) (tomado de Sokal and Sneath, 1963) se calcula la media de correlación del miembro a probar con el cluster al cual se podría unir y luego se halla la diferencia con la correlación del cluster ya establecido, si este valor es superior a 0.03 se descarta la posibilidad de incluir al nuevo miembro en el cluster ya establecido.

En nuestro caso probaremos los OTU's 2, 4, 5, 6 y 7 respectivamente.

a) $r(1-3) = 0.944$	$\bar{S}_n = \frac{1}{2} (0.833 + 0.888) = 0.8605$
$r(1-2) = 0.833$	
$r(3-2) = 0.888$	$0.944 - 0.8605 = 0.08 > 0.03$
b) $r(1-4) = 0.89$	$\bar{S}_n = 0.86$
$r(3-4) = 0.83$	$0.944 - 0.86 = 0.08 > 0.03$

c) r (1-5) = 0.83	$\bar{S}_n = 0.80$
r (3-5) = 0.78	$0.94 - 0.80 = 0.14 > 0.03$
d) r (1-6) = 0.61	$\bar{S}_n = 0.58$
r (3-6) = 0.55	$0.944 - 0.58 = 0.364 > 0.03$
e) r (1-7) = 0.61	$\bar{S}_n = 0.58$
r (3-7) = 0.55	$0.944 - 0.58 = 0.364 > 0.03$

De los datos obtenidos se deduce que ninguno de los OTU's pueden participar del grupo 1+3 establecido previamente.

Para calcular el próximo ciclo se debe recalcular los coeficientes de asociación. Para ello se utiliza la fórmula de suma de variables de Spearman (Sokal y Sneath, 1963):

$$r_{qQ} = \frac{\square_{qQ}}{\sqrt{q + 2\Delta q} \sqrt{Q + 2\Delta Q}}$$

\square_{qQ} = suma de todas las correlaciones entre miembros de un grupo con otro grupo.

Δq = suma de todas las correlaciones entre miembros del primer grupo.

ΔQ = suma de todas las correlaciones entre miembros del segundo grupo.

q = número de OTU's del grupo 1.

Q = número de OTU's del grupo 2.

En ese caso se trata de calcular la correlación entre un grupo y un OTU y la fórmula de Spearman se reduce a:

$$r_{xq} = \frac{\sum r_{xq}}{\sqrt{q + 2\Delta q}}$$

donde el numerador se refiere a la suma de todas las correlaciones del OTU considerado con los miembros del grupo.

En nuestro caso calcularemos:

$$r(1+3)2 = \frac{r(1-2) + r(3-2)}{\sqrt{2 + 2(r(1-3))}} = \frac{0.833 + 0.888}{\sqrt{2 + 2(0.944)}} = 0.873$$

$$r(1+3)4 = 0.873$$

$$r(1+3)5 = 0.816$$

$$r(1+3)6 = 0.591$$

$$r(1+3)7 = 0.591$$

Con estos datos se elabora la matriz 3 denominando 1' al grupo 1+3. En la matriz 3 se subraya el coeficiente de correlación más alto en cada columna. En este ciclo nos encontramos con el inconveniente de que hay dos OTU's (el 2 y el 4) que tienen el mismo coeficiente de similitud (0.873) con el grupo 1', siendo este valor el que representa la mayor correlación mutua. Para resolver este caso probaremos sucesivamente con uno y luego con el otro, hasta que, en algunos de los ciclos siguientes se observe que en uno de los dos caminos elegidos el grupo obtenido a partir del grupo original tenga un coeficiente de similitud máximo, del grupo con otro OTU, más grande que en el otro (I. G. Gamundi et al, 1975). Continuaremos agrupando con el OTU 4 y al finalizar los cálculos, se reharán los mismos pero agrupando con el OTU 2 y se elegirá aquél que dé un fenograma más "compacto".

$$r(1' + 4)2 = 0.824$$

$$r(1' + 4)5 = 0.794$$

$$r(1' + 4)6 = 0.563$$

$$r(1' + 4)7 = 0.563$$

Con estos datos se obtiene la matriz 4, los coeficientes que no han sido recalculados se toman de la matriz original de coeficientes de similitud. En la matriz 4 se denomina 1'' al grupo 1'+4; en esta matriz los coeficientes de correlación mutuamente más altos corresponden a 1'' con 2.

En base a esto se vuelven a calcular los coeficientes de similitud:

$$r (1'' + 2) 5 = 0.822$$

$$r (1'' + 2) 6 = 0.585$$

$$r (1'' + 2) 7 = 0.527$$

Con estos datos y los de la tabla original se construye la matriz 5. Denominamos $1'''$ al grupo $1''+2$. En ésta observamos que el coeficiente de correlación mutuamente más alto corresponde al grupo $1''' + 5$. Los nuevos coeficientes serán los siguientes:

$$r (1''' + 5) 6 = 0.539$$

$$r (1''' + 5) 7 = 0.508$$

Se elabora la matriz 6 y se denomina 1^{iv} al grupo $1''' + 5$. En esta matriz el coeficiente de correlación mutuo más alto es $1^{iv} - 6$. Calculamos el coeficiente del grupo 1^v ($1^{iv} + 6$) con 7:

$$r (1^{iv} + 6) 7 = 0.542$$

Se repetirá el proceso utilizando como el coeficiente de correlación mutua mayor el que corresponde al grupo $1^v - 2$.

Desde ahora en adelante, las matrices se indicarán en un orden numérico creciente para facilitar la comprensión del texto, omitiéndose su confección, ya que los datos de las mismas figuran en el texto.

$$r (1^v + 2) 4 = 0.824$$

$$r (1^v + 2) 5 = 0.823$$

$$r (1^v + 2) 6 = 0.592$$

$$r (1^v + 2) 7 = 0.534$$

Con estos datos se construye la matriz 7; $1''$ representa ahora al grupo $1^v + 2$. El mayor coeficiente mutuo corresponde a los grupos $1'' - 4$.

$$r (1'' + 4) 5 = 0.809$$

$$r (1'' + 4) 6 = 0.572$$

$$r (1'' + 4) 7 = 0.541$$

Construimos la matriz 8 y la denominamos $1'''$ al grupo $1'' + 4$. El mayor coeficiente mutuo en esta matriz corresponde al grupo $1''' - 5$.

$$r(1^{iii}+5)6 = 0.534$$

$$r(1^{iii}+5)7 = 0.517$$

Se construye la matriz 9 y se observa un mayor coeficiente de 1^{iv} ($1^{iii}+5$) con el OTU 6.

$$r(1^{iv}+6)7 = 0.548$$

Siguiendo el criterio mencionado anteriormente, vemos que en la matriz 4 el coeficiente de correlación de $1^i = (1^i+4)$ con 5 y con 6 son menores que en la matriz 7, donde 1^i es 1^i+2 , por lo tanto, este último agrupamiento sería más conveniente que el primero. En base a los resultados obtenidos con este último agrupamiento elaboramos el fenograma de la fig. 12C.

b) Método de los pares pesados

Han sido sugeridas varias modificaciones al método de agrupación de las variables pesadas. La variante más común es la denominada método de los pares pesados (Weighted pair-group method), en la cual sólo dos OTU's altamente correlacionados pueden participar de un grupo en cada ciclo de agrupamiento. Este método no necesita utilizar ningún criterio para admitir nuevos OTU's en un ciclo de dos ya establecido. En nuestro caso coincide con el ya calculado ya que no más de dos OTU's participan de cada grupo.

c) Método de los grupos no pesados (Unweighted group-method)

Esta es otra variante en la cual durante cada ciclo de agrupamiento se recomputa la correlación basándose en la matriz original. En este método, cada OTU tiene el mismo peso dentro de cada grupo, mientras que en el método pesado el OTU 2, por ejemplo, tiene el mismo peso que el grupo 1+3.

Usando el método de suma de variables de Spearman la computación se haría de la siguiente manera:

$$r(1^i+4)_2 = r(1+3+4)_2 = \frac{r(1-2) + r(3-2) + r(4-2)}{\sqrt{3 + 2(r(1-3) + r(1-4) + r(3-4))}} =$$

$$= \frac{0.833 + 0.888 + 0.722}{\sqrt{3 + 2(0.944 + 0.888 + 0.833)}} = 0.846$$

$$r (1' + 4) 5 = 0.808$$

$$r (1' + 4) 6 = 0.577$$

$$r (1' + 4) 7 = 0.577$$

Se elabora la matriz 10 donde $1'' = (1+3+4)$. Se observa que la correlación mutua más alta corresponde a $1''$ con 2, por lo tanto, el nuevo agrupamiento será $r (1'' + 2) = r (1+3+4+2)$.

$$r (1+3+4+2) 5 = 0.824$$

$$r (1+3+4+2) 6 = 0.589$$

$$r (1+3+4+2) 7 = 0.559$$

Se construye la matriz 11, denominando $1'''$ a $(1+3+4+2)$. El coeficiente mutuo de correlación mayor corresponde a $(1'''+5)$. los nuevos coeficientes serán, por lo tanto:

$$r (1'''+5) = r (1+3+4+2+5)$$

$$r (1'''+5) 6 = r (1+3+4+2+5) 6 = 0.575$$

$$r (1'''+5) 7 = r (1+3+4+2+5) 7 = 0.551$$

Se construye la matriz 12 con los datos obtenidos en el paso anterior. Vemos que el mayor coeficiente es con el OTU 6, si denominamos 1^{iv} a $(1+3+4+2+5)$:

$$r (1^{iv} + 6) = r (1+3+4+2+5+6)$$

$$r (1^{iv} + 6) 7 = r (1+3+4+2+5+6) 7 = 0.568$$

Se repite el proceso agrupando con el OTU 2.

En este caso, se parte de la matriz 3; se calcula el coeficiente de similitud de la misma manera que en el caso anterior, obteniéndose los siguientes resultados:

$$r (1' + 2) 4 = r (1+3+2) 4 = 0.846$$

$$r (1' + 2) 5 = r (1+3+2) 5 = 0.827$$

$$r (1' + 2) 6 = r (1+3+2) 6 = 0.596$$

$$r (1' + 2) 7 = r (1+3+2) 7 = 0.557$$

Se construye la matriz 13, denominando $1'' = 1+2 = 1+3+2$. Vemos que el coeficiente de asociación mutuamente mayor corresponde a $1''$ con 4.

$$r(1'' + 4) 5 = r(1+3+2+4) 5 = 0.824$$

$$r(1'' + 4) 6 = r(1+3+2+4) 6 = 0.589$$

$$r(1'' + 4) 7 = r(1+3+2+4) 7 = 0.559$$

Se ve que en este paso los valores coinciden con los obtenidos en el caso anterior, es decir, cuando se agrupa con el OTU 4, por lo tanto, de aquí en adelante los resultados serán coinc den tes.

En la matriz 10 los valores del coeficiente de similitud del OTU 1'' con 2 coinciden con el coeficiente de 1'' con 4 representado en la matriz 13, pero los valores del OTU's 1'' con 5 y con 6 son mayores en la matriz 13. Si seguimos utilizando el criterio enunciado anteriormente, elegiremos el OTU's 2 para agruparse en primer lugar con el grupo (1+3). En la fig. 12 B se muestra el fenograma obtenido mediante esta última a-grupacion.

2) Procesamiento de datos utilizando el coeficiente de Rogers y Tanimoto.

En la matriz 14 se representan los coeficientes de similitud ob ten idos utilizando el coeficiente de Rogers y Tanimoto. Siguiendo el mismo razonamiento que se realizó con el "simple matching coefficient" se realizará el análisis numérico de relación en tre los OTU's utilizando la fórmula de suma de variables de Spearman.

a.- Método de las variables pesadas (Weighted variable group-me-
thod)

En la matriz 14 se observa que el primer grupo está formado por 1+3, se prueba que ningún otro OTU's puede interve nir en el grupo 1+3 ya establecido, ya que realizando los cálculos indicados en el caso del "simple matching coeffi cient" ningún valor hallado por diferencia entre el coeffi cient del grupo obtenido y la media de asociación del miem bro a probar en el grupo ya establecido supera a 0.03.

En la matriz 15 se vuelcan los datos obtenidos de calcular:

$$r(1+3)2 = 0.778$$

$$r(1+3)4 = 0.778$$

$$r(1+3)5 = 0.693$$

$$r(1+3)6 = 0.423$$

$$r(1+3)7 = 0.423$$

Nuevamente los valores mayores de similitud con el grupo 1' coinciden con los OTU's 4 y 2. Se realizará el proceso calculando ambos independientemente y luego se elegirá aquel agrupamiento que de valores más altos en algún ciclo.

Se calculará en primer lugar agrupando con el OTU 4.

Denominaré $1' + 4 = 1''$

$$r(1''+2)2 = 0.712$$

$$r(1''+2)5 = 0.667$$

$$r(1''+2)6 = 0.401$$

$$r(1''+2)7 = 0.401$$

Dado que ningún valor hallado por diferencia entre el coeficiente del grupo obtenido y la media de correlación del miembro a probar con el grupo establecido supera a 0.03, ningún otro OTU interviene en el grupo $1' + 4$.

Con los valores obtenidos se calcula la matriz 16.

El valor de correlación mutuo más alto es con el OTU 2:

$$r(1''+2)5 = 0.704$$

$$r(1''+2)6 = 0.424$$

$$r(1''+2)7 = 0.370$$

Se construye la matriz 17 denominando $1''' = 1''+2$; la mayor correlación mutua es con el OTU 5.

$$r(1''' + 5)6 = 0.384$$

$$r(1''' + 5)7 = 0.354$$

Llamamos 1^{iv} a $1''' + 5$ y se construye la matriz 18, donde el mayor valor de correlación mutuo es con el OTU 6.

$$r(1^{iv} + 6)7 = 0.384$$

Repitiendo el mismo proceso y agrupando con el OTU 2, volvemos a la matriz 15.

$$r (1' + 2) 4 = 0.712$$

$$r (1' + 2) 5 = 0.705$$

$$r (1' + 2) 6 = 0.428$$

$$r (1' + 2) 7 = 0.375$$

Se construye la matriz 19, denominando $1''' = 1' + 2$.

El mayor coeficiente mutuo de correlación es con el grupo 4.

$$r (1''' + 4) 5 = 0.686$$

$$r (1''' + 4) 6 = 0.411$$

$$r (1''' + 4) 7 = 0.382$$

Se denomina $1'''' = 1''' + 4$ y se construye la matriz 20.

El mayor coeficiente de correlación mutuo es $1''''$ con 5.

$$r (1'''' + 5) 6 = 0.379$$

$$r (1'''' + 5) 7 = 0.363$$

Se construye la matriz 21 denominando $1^{iv} = 1'''' + 5$. Como el mayor coeficiente de correlación mutuo es con el OTU 6 calculamos:

$$r (1^{iv} + 6) 7 = 0.390$$

El coeficiente de correlación de $1''$ (siendo $1'' = 1'+4$) con 5 y 6 en la matriz 16 es menor que en la matriz 19 donde $1'' = 1' + 2$. Utilizando el mismo criterio que al usar el "simple matching coefficient" elegimos el agrupamiento con el OTU 2. Con los datos obtenidos se realiza el fenograma de la fig. 13 C.

Igual que en el caso del "simple matching coefficient" hay coincidencia en los valores obtenidos por el: a) Método de las variables pesadas y el b) Método de los pares pesados, ya que solo dos OTU's altamente correlacionados participaron de cada ciclo de agrupamiento.

b.- Método de los grupos no pesados (Unweighted group-method)

Se parte de la matriz 15, donde el mayor coeficiente de correlación mutuo corresponde al $1'+2$ y $1'+4$, siendo $1'=1+3$.

Agruparemos, en primer lugar, con el OTU 4:

$$r(1' + 4) 2 = r(1+3+4) 2 = 0.743$$

$$r(1' + 4) 5 = r(1+3+4) 5 = 0.685$$

$$r(1' + 4) 6 = r(1+3+4) 6 = 0.413$$

$$r(1' + 4) 7 = r(1+3+4) 7 = 0.413$$

Se construye la matriz 22, donde la mayor correlación mutua es con el OTU 2. Denominando $1^{ii} = 1 + 3 + 4$.

$$r(1^{ii} + 2) 5 = 0.708$$

$$r(1^{ii} + 2) 6 = 0.427$$

$$r(1^{ii} + 2) 7 = 0.400$$

Se representa la matriz 23 donde $1^{iii} = 1+3+4+2$. Dado que la correlación mutua mayor es con el OTU 5 se calcula:

$$r(1^{iii} + 5) 6 = 0.419$$

$$r(1^{iii} + 5) 7 = 0.397$$

Se confecciona la matriz 24 denominando $1^{iv} = 1+3+4+2+5$. En esta matriz se ve que el OTU 6 es el que presenta la mayor correlación mutua:

$$r(1^{iv} + 6) 7 = r(1+3+4+2+5+6) 7 = 0.413$$

Agrupando ahora con el OTU 2, partiendo nuevamente de la matriz 15 se ve que:

$$r(1' + 2) 4 = r(1+3+2) 4 = 0.743$$

$$r(1' + 2) 5 = r(1+3+2) 5 = 0.710$$

$$r(1' + 2) 6 = r(1+3+2) 6 = 0.432$$

$$r(1' + 2) 7 = r(1+3+2) 7 = 0.396$$

Se obtiene la matriz 25, donde el coeficiente de correlación mutuo más alto es con el OTU 4. Se denomina $1^{iii} = 1^{ii}+4 = 1+3+2+4$. De aquí en adelante los valores que se obtendrán son los mismos que los obtenidos al agrupar con el OTU 4. Siguiendo el mismo criterio expresado anteriormente, se elige la agrupación con el OTU 2. Con los datos obtenidos se realiza el fenograma de la fig. 13B.

3) Procesamiento de datos utilizando el coeficiente de Jaccard
Los coeficientes de similitud hallados por este coeficiente de asociación, se encuentran representados en la matriz 26.

a.- Método de las variables pesadas (WVGM)

La correlación mutua más alta es entre los OTU's 1 y 3.

$$r(1+3) 2 = 0.535$$

$$r(1+3) 4 = 0.588$$

$$r(1+3) 5 = 0.496$$

$$r(1+3) 6 = 0$$

$$r(1+3) 7 = 0.126$$

Usando el método mencionado para los otros coeficientes se determina que ningún otro OTU puede participar del grupo ya establecido.

Se construye la matriz 27, denominando $1' = 1+3$. La mayor correlación mutua es con el OTU 4.

$$r(1'+4) 2 = 0.460$$

$$r(1'+4) 5 = 0.489$$

$$r(1'+4) 6 = 0$$

$$r(1'+4) 7 = 0.127$$

La mayor correlación mutua corresponde al OTU 5. En la matriz 28 se denomina $1'' = 1'+4$.

$$r(1''+5) 2 = 0.515$$

$$r(1''+5) 6 = 0$$

$$r(1''+5) 7 = 0.126$$

En la matriz 29, $1''' = 1'' + 5$. La mayor correlación mutua es con el OTU 2.

$$r(1''' + 2) 6 = 0$$

$$r(1''' + 2) 7 = 0.084$$

Denominamos $1^{iv} = 1''' + 2$ en la matriz 30.

$$r(1^{iv} + 7) 6 = 0$$

M A T R I Z 1

Espectro de compuestos fenólicos marcadores de cada especie
(1 = presente - 0 = ausente)

OTU's	Compuestos fenólicos																	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
1) <u>B. foliosa</u>	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2) <u>B. bonariensis</u>	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3) <u>B. carrapo</u>	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4) <u>B. arborea</u>	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5) <u>B. schickendantzii</u>	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6) <u>B. retama</u>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0
7) <u>B. sarmientoi</u>	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1

M A T R I Z 3

	1'	2	4	5	6	7
1'	1	0.873	0.873	0.816	0.591	0.591
2	0.873	1	0.722	0.777	0.555	0.444
4	0.873	0.722	1	0.722	0.500	0.500
5	0.816	0.777	0.722	1	0.444	0.444
6	0.591	0.555	0.500	0.444	1	0.444
7	0.591	0.444	0.500	0.444	0.444	1

M A T R I Z 4

	1''	2	5	6	7
1''	1	0.824	0.794	0.563	0.563
2	0.824	1	0.777	0.555	0.444
5	0.794	0.777	1	0.444	0.444
6	0.563	0.555	0.444	1	0.444
7	0.563	0.444	0.444	0.444	1

M A T R I Z 5

	<u>1'''</u>	<u>5</u>	<u>6</u>	<u>7</u>
1'''	1	0.822	0.585	0.527
5	0.822	1	0.444	0.444
6	0.585	0.444	1	0.444
7	0.527	0.444	0.444	1

M A T R I Z 6

	<u>1^{iv}</u>	<u>6</u>	<u>7</u>
1 ^{iv}	1	0.539	0.508
6	0.539	1	0.444
7	0.508	0.444	1

M A T R I Z 14

Coefficientes de similitud obtenidos por el método de
Rogers y Tanimoto

OTU's	1	2	3	4	5	6	7
1) <u>B. foliosa</u>	1	0.714	0.894	0.800	0.714	0.440	0.440
2) <u>B. bonariensis</u>	0.714	1	0.800	0.565	0.636	0.384	0.285
3) <u>B. carrapo</u>	0.894	0.800	1	0.714	0.636	0.384	0.384
4) <u>B. arborea</u>	0.800	0.565	0.714	1	0.565	0.333	0.333
5) <u>B. schickendantzii</u>	0.714	0.636	0.636	0.565	1	0.285	0.285
6) <u>B. retama</u>	0.440	0.384	0.384	0.333	0.285	1	0.285
7) <u>B. sarmientoi</u>	0.440	0.285	0.384	0.333	0.285	0.285	1

M A T R I Z 26

Coefficientes de similitud obtenidos por el método de
Jaccard

OTU's	1	2	3	4	5	6	7
1) <u>B. foliosa</u>	1	0.400	0.750	0.600	0.500	0	0.125
2) <u>B. bonariensis</u>	0.400	1	0.600	0.285	0.428	0	0
3) <u>B. carrapo</u>	0.750	0.600	1	0.500	0.428	0	0.111
4) <u>B. arborea</u>	0.600	0.285	0.500	1	0.375	0	0.100
5) <u>B. schickendantzii</u>	0.500	0.428	0.428	0.375	1	0	0.090
6) <u>B. retama</u>	0	0	0	0	0	1	0
7) <u>B. sarmientoii</u>	0.125	0	0.111	0.100	0.090	0	1

V.5.- Desarrollo de los métodos mediante computación

Como fue mencionado en la sección V.2.- se realizaron mediante computación los métodos "UPGMA" y "Completo" utilizándose en cada caso coeficientes de correlación, de distancia y los coeficientes de asociación con que se trabajó en el desarrollo manual.

Tomando como base las matrices donde se hallan representados los valores de asociación deducidos de los tres coeficientes utilizados, se obtuvo un fenograma resultante en cada uno de los casos:

- a) Coeficiente de asociación "simple matching" - Método UPGMA (fig. 12 A)
- b) Coeficiente de asociación "simple matching" - Método Completo (fig. 12 D)
- c) Coeficiente de asociación de Jaccard - Método UPGMA (fig. 14 A)
- d) Coeficiente de asociación de Jaccard - Método Completo (fig. 14 C)
- e) Coeficiente de asociación de Rogers y Tanimoto Método UPGMA (fig. 13 A)
- f) Coeficiente de Asociación de Rogers y Tanimoto Método Completo (fig. 13 D)
- g) Coeficiente de correlación de Pearson - Método UPGMA (fig. 15 B)
- h) Coeficiente de correlación de Pearson - Método Completo (fig. 15C)
- i) Coeficiente de distancia "Taxonomic distance" Método UPGMA (fig. 15 A)

En cada fenograma se obtuvo un coeficiente de correlación cofenética (C.C.C.) con los siguientes valores:

- | | |
|-------------------|-------------------|
| a) C.C.C. = 0.945 | f) C.C.C. = 0.938 |
| b) C.C.C. = 0.936 | g) C.C.C. = 0.977 |
| c) C.C.C. = 0.970 | h) C.C.C. = 0.960 |
| d) C.C.C. = 0.939 | i) C.C.C. = 0.959 |
| e) C.C.C. = 0.950 | |

Los resultados de los coeficientes de correlación cofenética indican que, prácticamente, no hubo distorsión entre la matriz original de datos y los fenogramas obtenidos.

V.6.- Resultados

Mediante la aplicación de técnicas numéricas se obtuvieron resultados que deben ser interpretados como estructuras taxonómicas puramente fenéticas, sin connotaciones filogenéticas.

Existe una notoria coincidencia en el ordenamiento de los siete OTU's en el desarrollo de los métodos "UPGMA", "WVGM" ("WPGM") y "UWGM" utilizando los coeficientes de asociación "simple matching" y "Rogers y Tanimoto". Como se puede observar en los fenogramas de las figs. 12 y 13, podrían delimitarse tres grupos: A) integrado por los OTU's 1 (B. foliosa), 3 (B. carrapo), 2 (B. bonariensis), 4 (B. arborea) y 5 (B. schickendantzii); el OTU 6 (B. retama) y el OTU 7 (B. sarmientoi) constituirían dos grupos con pocas semejanzas con el grupo A y entre sí. B. retama y B. sarmientoi, por lo tanto, formarían dos grupos fenéticos B y C separados entre sí y del anterior, A.

En los fenogramas obtenidos mediante el método WVGM (Figs. 12C y 13C) se observa que el OTU 7 está asociado con el OTU 6 a un nivel levemente superior que el OTU 6 con el resto de los OTU's. Estas reversiones son frecuentes cuando se usa el método de Spearman (Sneath and Sokal, 1973).

Utilizando el método de agrupamiento "Completo" se podrían agrupar los OTU's en tres grupos A, B y C al igual que en los métodos anteriores. Con respecto a los resultados obtenidos en los métodos

todos anteriores hay una pequeña variación dentro del grupo A en cuanto a la afinidad de los OTU's 4 y 5 con los OTU's 1, 2 y 3 (Figs. 12D y 13D). Dicha variación es pequeña y no afectaría los resultados finales obtenidos.

Con los mismos métodos de agrupación mencionados pero utilizando el coeficiente de asociación de Jaccard, se obtuvieron tres grupos fenéticos A, B y C constituidos de la misma manera que al utilizar los otros coeficientes. Hay diferencias en el ordenamiento de los OTU's dentro del grupo A. B. retama (OTU 6) presenta un coeficiente de similitud 0 con cualquiera de los otros OTU's dado que no presenta ningún compuesto en común con ellos (Fig. 14).

Cuando se utilizó el coeficiente de correlación del momento producto de Pearson y el coeficiente de distancia, se obtuvo coincidencia con los resultados anteriores en cuanto a que B. retama y B. sarmientoi formarían dos OTU's aislados del resto de las especies y entre sí. Dentro del grupo A, las relaciones entre las especies fueron variables y no se pudo encontrar grupos definidos dentro del mismo, lo que, como será explicado más adelante, se debe al bajo número de compuesto que diferencian a las especies que integran dicho grupo.

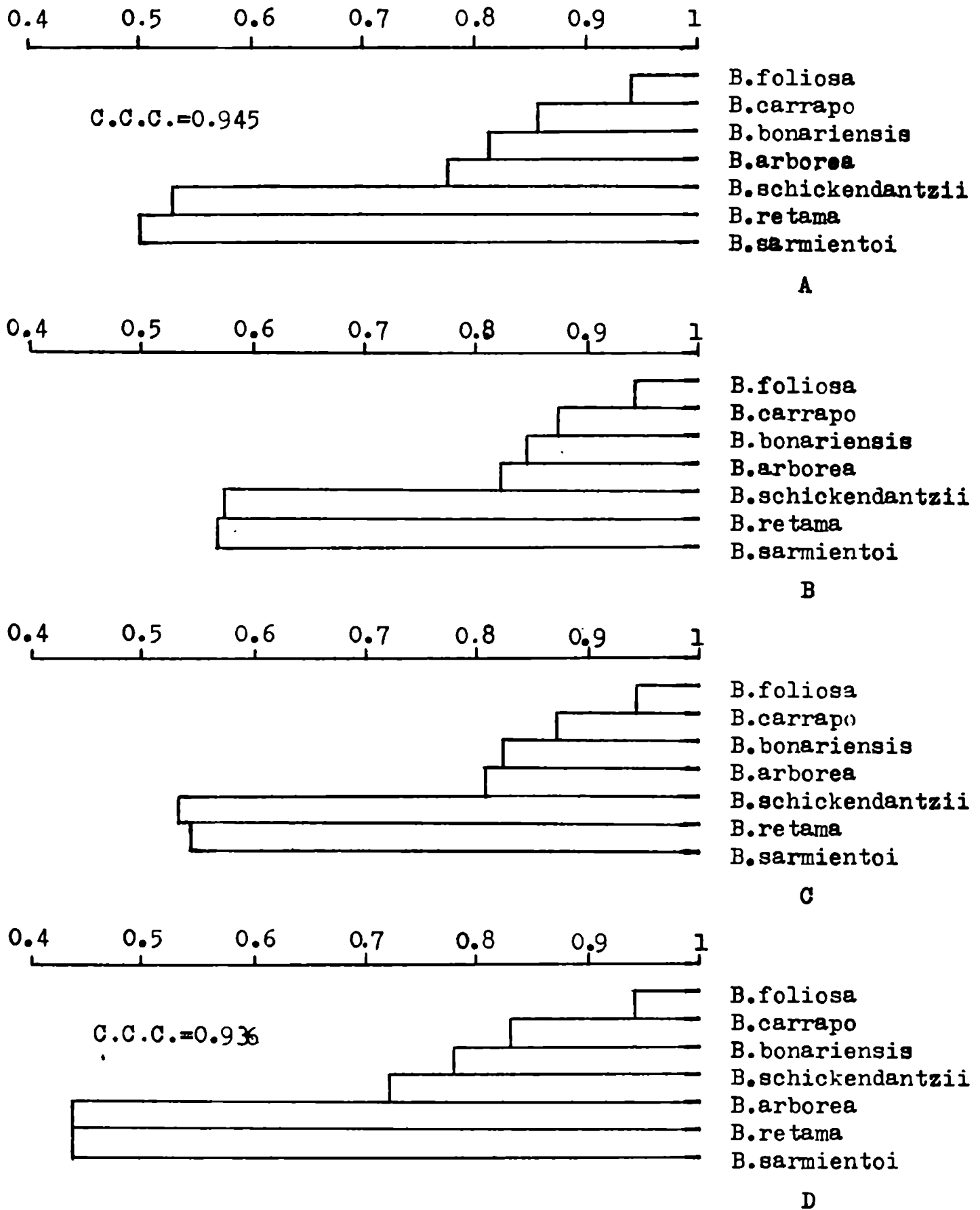
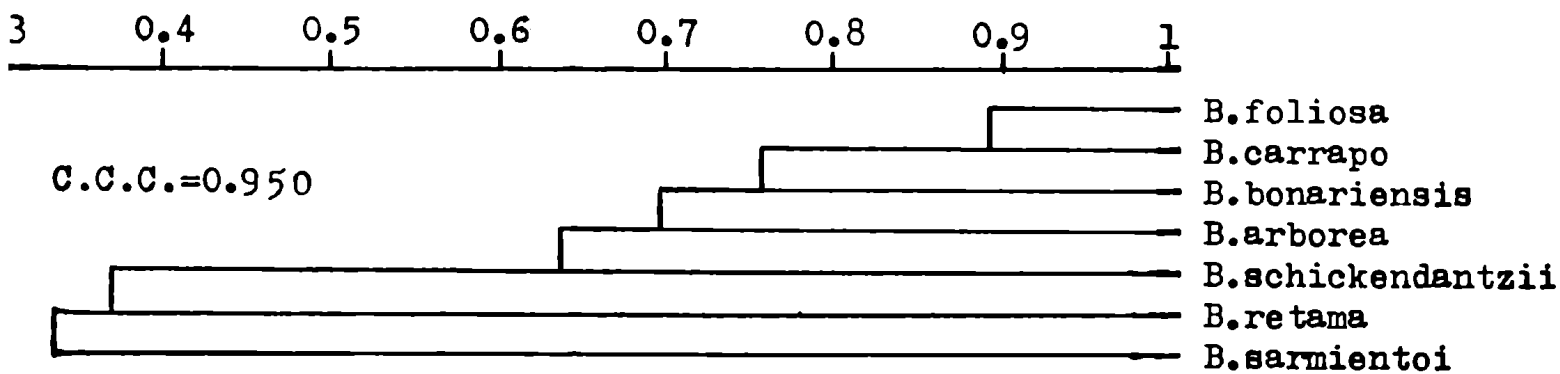
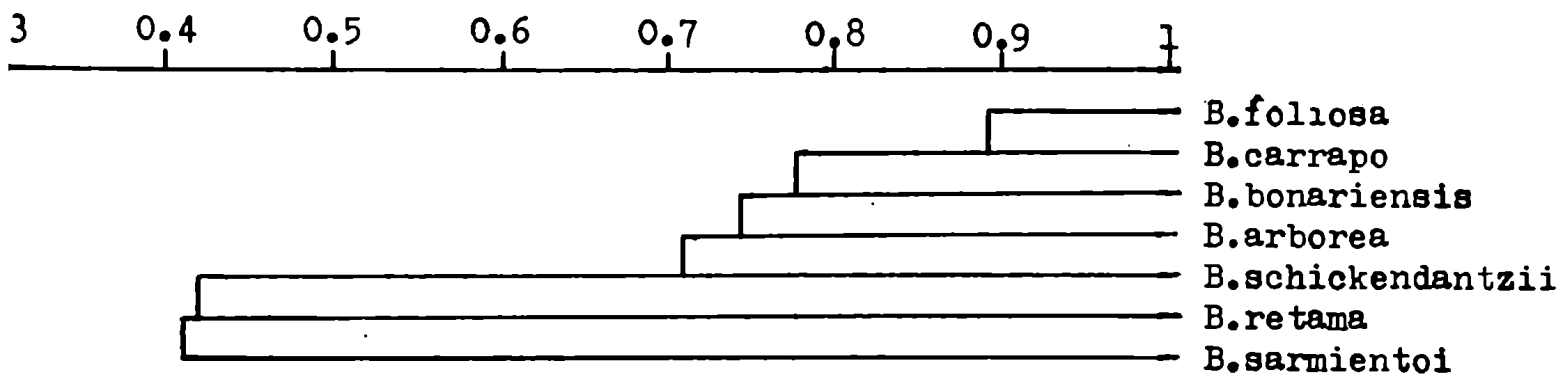


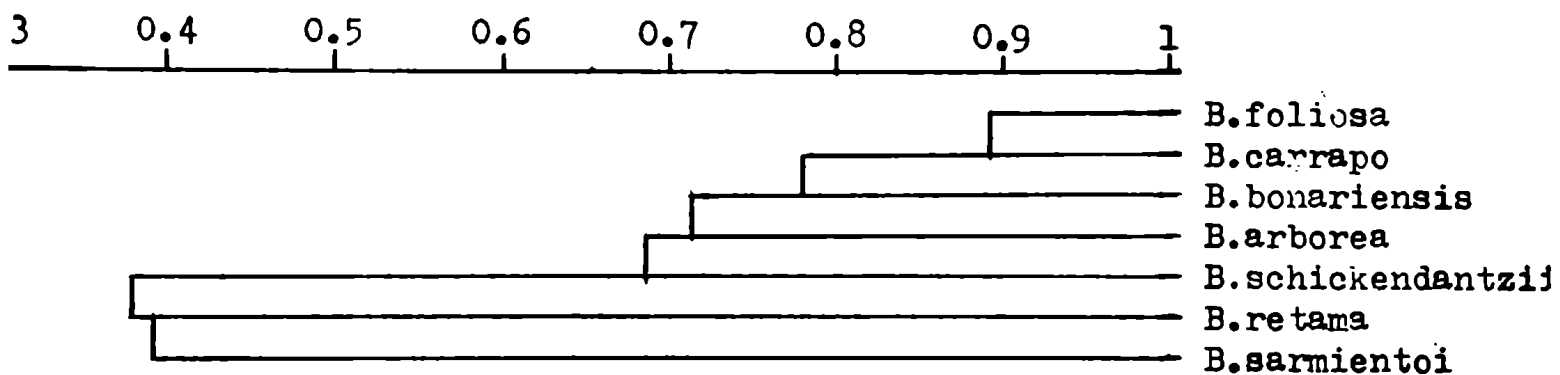
Figura 12. Fenogramas obtenidos utilizando el coeficiente de asociación "Simple Matching": A= Método de los pares no pesados usando medias aritméticas (UPGMA); B=Método de los grupos no pesados (UWGM); C=Método de los grupos pesados (WVGM); D= Método "Completo".



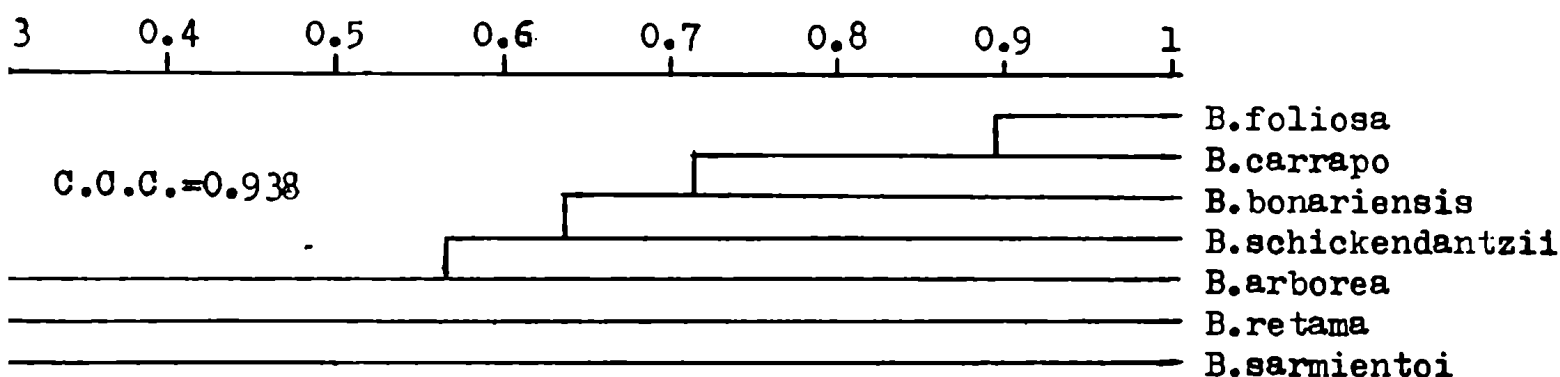
A



B



C



D

Figura 13. Fenogramas obtenidos utilizando el coeficiente de asociación de "Rogers y Tanimoto": A= Método UPGMA; B= Método UWGM; C= Método WVGM; D= Método "Completo".

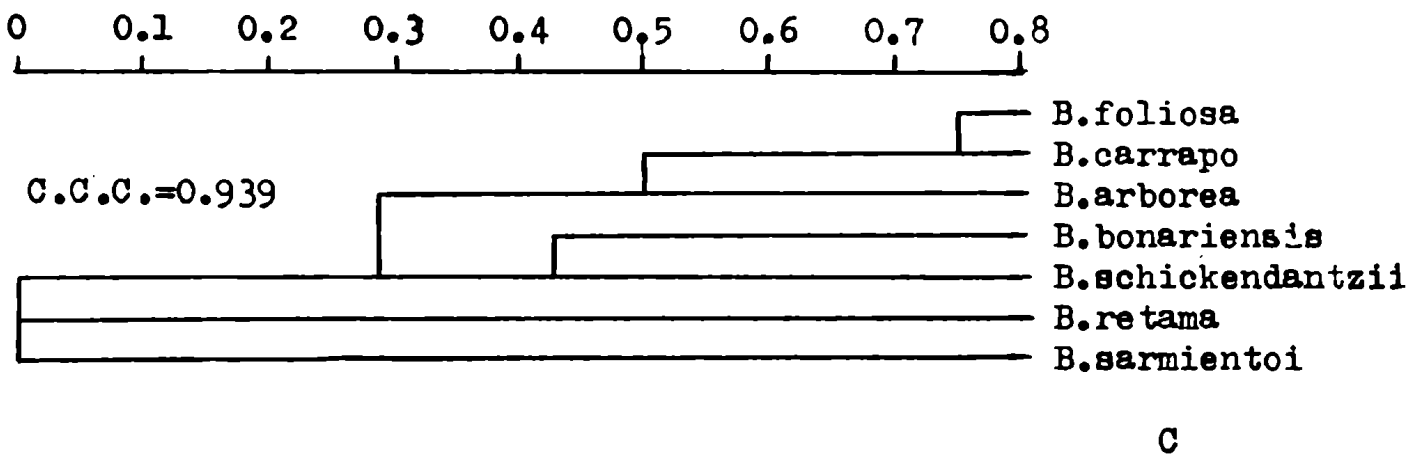
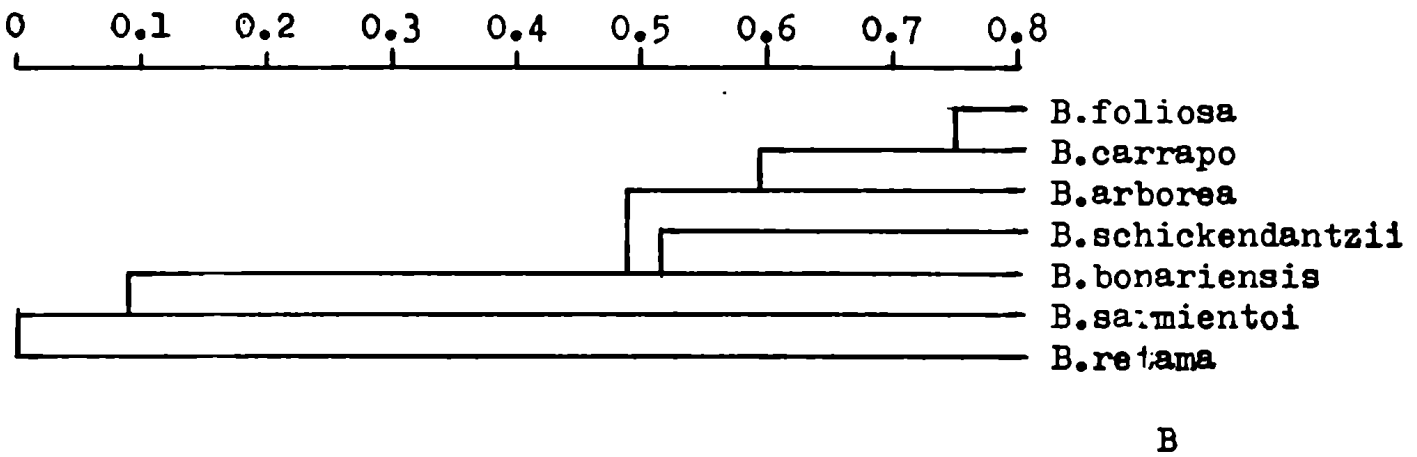
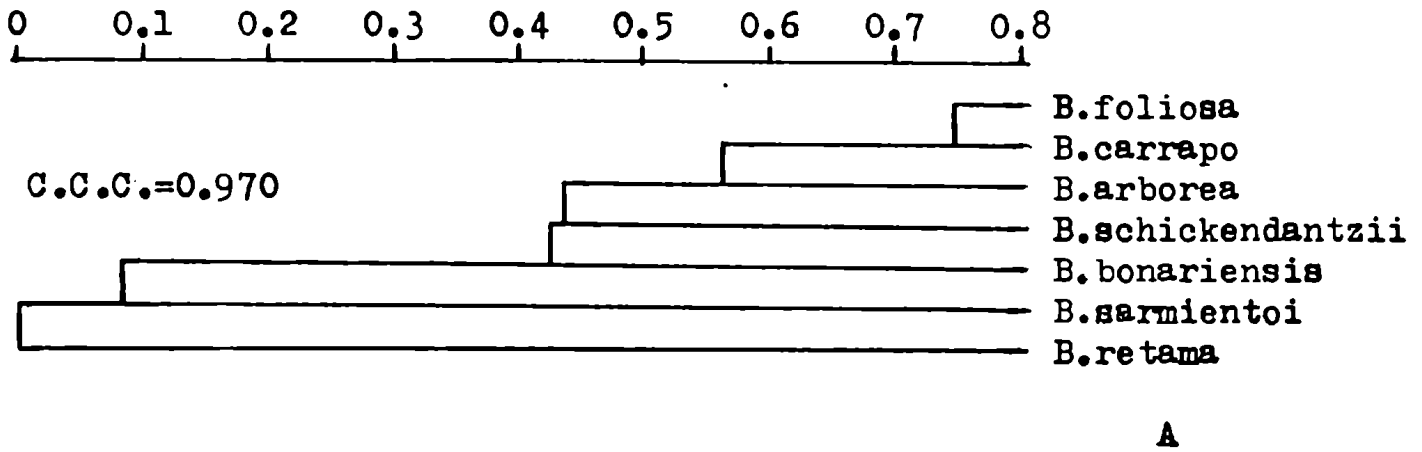


Figura 14. Fenogramas obtenidos utilizando el coeficiente de asociación de "Jaccard": A= Método UPGMA; B= Método WVGM; C= Método "Completo".

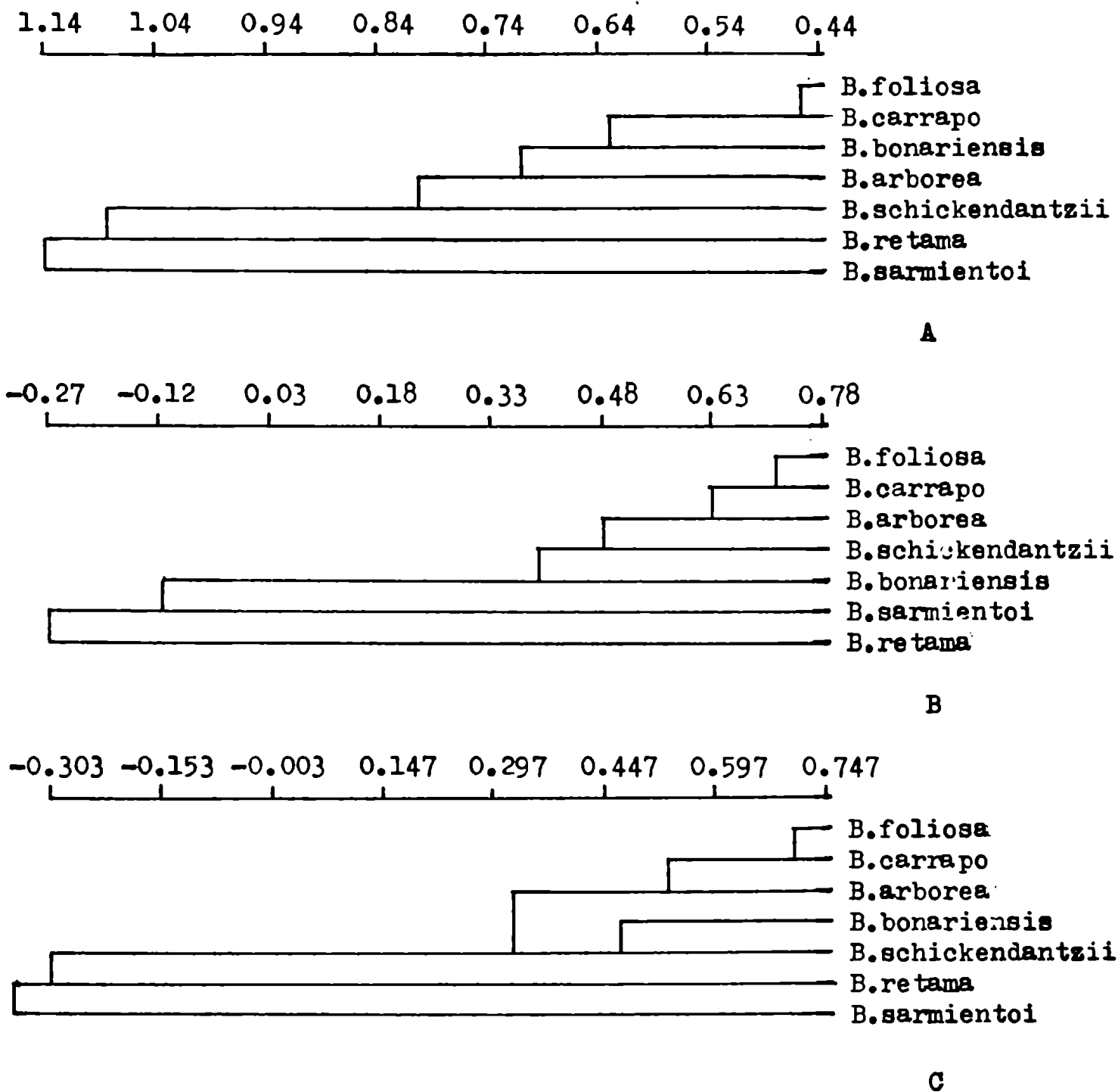


Figura 15. Fenogramas obtenidos utilizando coeficientes de correlación y distancia: A= Coef. de distancia, método UPGMA; B= Coef. de correlación, método UPGMA; C= Coef. de correlación, método Completo.

VI.- CITOESPECTROFOTOMETRIA

VI.1.- Introducción

El ácido desoxirribonucleico es el portador de la información genética y los cambios cuantitativos y cualitativos del mismo han jugado un papel importante en la evolución de los organismos. La investigación de estos cambios podrán dar pautas para explicar la diversidad y divergencia de las especies y permitirá comprender, en parte, la naturaleza y el origen de la variación hereditaria.

El incremento y el decrecimiento en la cantidad de DNA celular conjuntamente con cambios en la secuencia de nucleótidos serían las dos modificaciones importantes del DNA que contribuyen al proceso evolutivo (Hinegardner, 1976).

Se han encontrado evidencias de ambos tipos de variaciones del DNA, cualitativas y cuantitativas, en diferentes organismos. Las primeras se refieren a diferencias en las secuencias o en las proporciones de las bases que lo componen y la segunda a la cantidad de DNA que contienen los núcleos.

El contenido de DNA puede cambiar por variaciones numéricas tales como aneuploidía o poliploidía, pero también se ha encontrado variación en un mismo nivel de ploidía en especies de un mismo género (Jones and Rees, 1968; Rees et al., 1966; Martin and Shanks, 1966; Miksche and Hotta, 1973; Southern, 1967).

También en el reino animal se ha trabajado mucho en este campo y se pueden citar, entre otros, los trabajos realizados en Pseudocalanus (McLaren et al., 1966), en anfibios (Becak et al., 1967), en cordados primitivos (Atkin et al., 1967), en el género Oligochaeta (Christensen, 1966) y en acrídidos (John and Hewitt, 1966).

La cantidad de DNA puede cambiar de varias maneras: 1) cambios numéricos como poliploidía o aneuploidía; 2) amplificación (aumento) o deficiencia, ya sea longitudinal o por polinemia diferencial y 3) aparición de cromosomas B o supernumerarios. En el pri-

mer caso, los poliploides presentarán, teóricamente, un aumento proporcional al número de genomas que contienen con respecto al diploide, es decir, un 4x tendría el doble de DNA nuclear que su correspondiente diploide, etc. (Becak et al., 1967). Esto no siempre es así, pues, en algunos casos, se han observado tetraploides con menor contenido de DNA que sus probables antecesores diploides (Rees, 1972; Dowrick y El Bayoumi, 1969; Grant, 1969).

La aneuploidía también produce cambios en el contenido de DNA, a veces estos cambios pueden no ser detectados con los métodos de medición usuales si las diferencias entre las células aneuploides y las normales son muy pequeñas como, por ejemplo, monosomía o trisomía para un cromosoma muy pequeño del complemento.

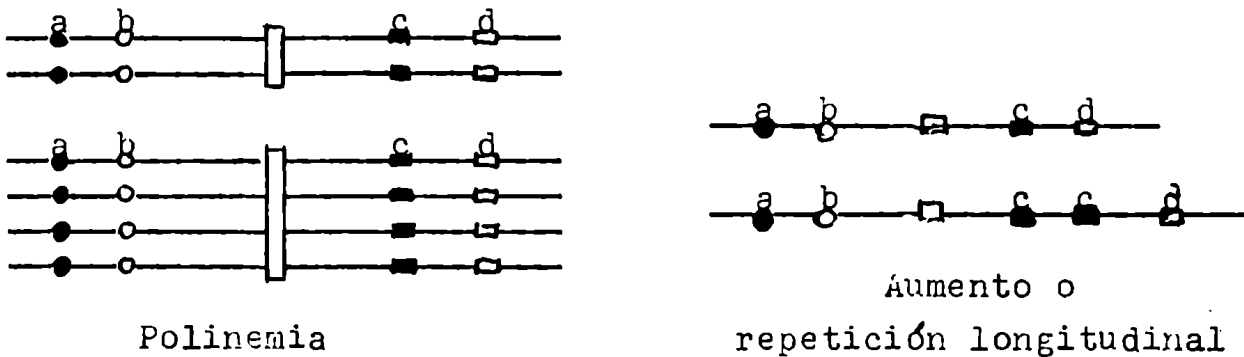
Amplificación se refiere a aumento del contenido de DNA. Este aumento puede tener varios significados (Stebbins, 1971):

- 1) Un alto contenido de DNA nuclear indicaría la existencia de un gran número de genes activos y una gran diversidad de la función génica. Si existen dos o más genes que codifican para una misma función uno de ellos puede mutar mientras que el otro mantiene su función esencial, apareciendo de esta manera nuevas funciones enzimáticas;
- 2) El alto contenido de DNA implicaría secuencias sin sentido, sin valor adaptativo. Esta hipótesis no es muy consistente pues existen géneros muy antiguos que presentan en varias especies cromosomas grandes, con una gran constancia dentro del género (Trillium, Pinus). Dicha constancia no podría haber sido mantenida y el contenido de DNA inicial podría haber disminuído por deficiencias al azar, de no haber resultado perjudicial este proceso;
- 3) Organismos con un alto contenido de DNA nuclear poseerían todos o parte de sus locus génicos duplicados muchas veces, teniendo estas duplicaciones un valor adaptativo.

Con respecto a los mecanismos de variación de los cambios mencionados existen dos posibilidades (Rees, 1972; Stebbins, 1971):

- a) Polinemia diferencial: implica variaciones en la multiplicidad lateral de filamentos de DNA dentro de los cromosomas.
- b) Aumento o repetición de segmentos que ocurren longitudinalmente en los cromosomas.

Los mecanismos mencionados pueden esbozarse de la siguiente manera (tomado de Rees, 1972):



Ambas teorías se encuentran en vigencia aunque Rees (1972) opina que habría más evidencias en favor de la segunda. Las evidencias en favor de la polinemia diferencial serían:

- La discontinuidad en los valores de DNA observados, por ejemplo, en el subgénero Vicia del género Vicia, donde existe una serie discontinua que se aproxima a una progresión 1:2:4, lo que reflejaría multiplicidad diferencial de los filamentos de DNA en el núcleo de las distintas especies (Martin and Shanks, 1966; Rees, 1972).
- El hecho de que la longitud relativa de los cromosomas dentro de las especies relacionadas se mantengan constantes aún cuando la longitud absoluta y contenido de DNA sea variable. Esto ocurre en el género Anemone (Rothfels et al., 1966) pero como muy bien observa Rees (1972), ordenar los cromosomas en orden de tamaño no es ordenarlos en orden de homología y en Lolium (Rees, 1966) y en Allium (Jo

nes and Rees, 1968) se encuentran bivalentes asimétricos que no son interpretables en base a la polinemia diferencial. Para resolver este tipo de problemas es necesario estudiar, además de las metafases mitóticas, el comportamiento de los híbridos en la meiosis. Rees, de todas maneras, no excluye la existencia de la polinemia acompañando a la duplicación longitudinal de segmentos cromosómicos.

- Existen, además, estudios en microscopía electrónica que mostrarían que el número de fibrillas en los cromosomas de V. faba es mayor que en los de V. sativa que tendría un contenido de DNA menor.

Evidencias en favor de aumento o repetición y disminución longitudinal de segmentos cromosómicos se obtienen en el estudio realizado por Keyl (1965) en Chironomus donde se demuestra que hay una variación localizada del DNA puesto que, en ciertas bandas, los cromosomas politénicos de Ch. thummi thummi el DNA esta incrementado por un factor de 2,4,8 o aún 16 en comparación con las bandas correspondientes de Ch. thummi piger. Jones y Rees (1968) observaron en los géneros Allium y Lolium diferencias en la longitud de los cromosomas homólogos y del contenido de DNA en distintas especies. Los híbridos en F₁ presentan en paquitene loops no apareados lo que es interpretado como un cambio en el contenido de DNA por deficiencia o repetición pero, en ambos casos, longitudinal.

Por supuesto, estas evidencias no excluyen la posibilidad de que existan diferencias en la polinemia de las especies consideradas, pero parte de la variación observada se debería a duplicación cromosómica (Rees et al., 1966). Además, se ha establecido en numerosos organismos, incluyendo a las plantas superiores, la existencia de repeticiones localizadas de secuencias de bases lo que ha sido demostrado por análisis bioquímicos directos (Britten and Kohne, 1968; Rees, 1972).

Se ha encontrado reducción filogenética en el tamaño cromosómico en varios géneros. La disminución en el contenido de DNA resulta fácilmente explicable si se tiene en cuenta la hipótesis de los cambios longitudinales de segmentos cromosómicos.

En la historia de la vida de la tierra el contenido de DNA ha ido en aumento aunque no de una manera continua; en organismos unicelulares y multicelulares con una organización simple y un bajo grado de integración hay correlación entre grado de avance evolutivo e incremento de DNA. Entre formas más complejas (plantas vasculares y vertebrados) esta correlación no existiría. En el reino vegetal el contenido de DNA nuclear modal entre algas y hongos es menor que en briofitas y éstas, a su vez, tienen valores menores que las plantas vasculares. El-Lakany y Dugle (1972) establecieron en varios grupos vegetales que los taxa mas evolucionados tienen menor contenido de DNA. En el reino animal habría un incremento desde los invertebrados inferiores (como esponjas y celenterados) a los invertebrados superiores. En los vertebrados terrestres la evolución se acompañaría de decrecimiento de DNA. Resumiendo, en los grupos mas complejos ha habido, en general, incremento y decrecimiento de DNA, siendo ambos importantes en el proceso evolutivo. (Stebbins, 1966, 1971; Hinegardner, 1976).

El contenido de DNA ha sido correlacionado con varios hechos (Stebbins, 1966):

- a) con el volumen cromosómico (Jones and Rees, 1968);
- b) con la adaptación climática: géneros con cromosomas grandes se encuentran en climas templados, en cambio los que tienen cromosomas medianos o pequeños se relacionarían con climas tropicales o subtropicales. Este hecho ha sido observado en Gramíneas, Liliales y Leguminosas (Stebbins, 1966);
- c) con la longitud del ciclo mitótico, que sería mas largo cuanto mayor sea el contenido de DNA debido a una prolongación de ciertas fases de la acción génica. Esto permitiría dedu

cir que la variación del contenido de DNA en organismos superiores tendría una significación adaptativa como método de regulación de la secuencia de la acción génica;

- d) con una distribución diferencial de la heterocromatina en interfase puesto que se ha observado que en el caso de gramíneas con cromosomas grandes, se distribuye en grandes regiones, mientras que en las que tienen cromosomas pequeños se ubican en cromómeros cerca del centrómero. La heterocromatina tendría una función reguladora influenciando la acción de los genes ligados o asociados con ella;
- e) con el tamaño del cuerpo del adulto en algunos organismos; en plantas, los poliploides tienen en general mayor tamaño que sus progenitores diploides;
- f) existiría una correlación positiva entre contenido de DNA y tamaño celular y nuclear (Hinegardner, 1976).

Hinegardner (1976) comenta que, los miembros con menor contenido de DNA en un grupo tienden a ser especializados y que especialización y bajo contenido de DNA son hechos comunes en los organismos. En animales y plantas, las especies primitivas tienen, a menudo, más DNA que el valor medio del taxon considerado. En el género Crepis, por ejemplo, las especies que son morfológicamente más primitivas tienen cromosomas grandes, mientras que las especies anuales, especializadas, tienen cromosomas más pequeños (Stebbins, 1966). En el género Allium, en cambio, los cambios evolutivos involucrarían ambos procesos de aumento y decrecimiento en la cantidad de DNA y tamaño de los cromosomas (Jones and Rees, 1968). En realidad, como fue puntualizado por Stebbins (1966, 1971) dentro de los grupos más complejos en el reino animal y vegetal no hay una correlación generalizada entre el contenido de DNA nuclear y grado de avance evolutivo, aunque tendencias definidas pueden establecerse para ciertos géneros en particular y, por ende, pueden detectarse tendencias hacia aumento de DNA y tamaño de cromosomas, así también como de disminución de los mismos.

Otra de las características enunciadas por Hinegaróner (1976) sería que la media del contenido de DNA de un grupo, tal como un orden o una clase, parecería estar correlacionado inversamente con el número de especies del grupo. Esta observación, según mi criterio, carecería de significado evolutivo.

La estimación cuantitativa del DNA ha sido realizada en los últimos años aplicando técnicas microespectrofotométricas. El desarrollo de estos métodos ha permitido un rápido análisis de la cantidad de DNA nuclear en diferentes tejidos y organismos, lo que ha abierto un campo importante de experimentación en la biología.

Por todo lo mencionado anteriormente, se ve que el estudio del contenido de DNA puede, en muchos casos, dar una idea de los principales hechos del proceso evolutivo en ciertos grupos. También puede ser muy útil en la investigación del probable origen de híbridos entre taxones que difieren en el contenido de DNA. Si el híbrido no es tan antiguo como para que haya habido cambios en su contenido o en el de las probables especies progenitoras, el valor esperado en el híbrido sería intermedio al de los probables antecesores. De esta manera, esta técnica ha sido utilizada en el estudio del posible donante del genomio B en los trigos (Rees and Walters, 1965). También puede dar una idea del nivel de ploidía en casos donde resulta laborioso realizar el recuento cromosómico, aunque en este aspecto el método debe ser aplicado con mucha cautela pues no siempre existe correlación entre contenido de DNA y número cromosómico. En algunos casos, estos estudios pueden dilucidar si las diferencias observadas en el tamaño cromosómico se deben a factores génicos (Darlington, 1964) o a diferencias efectivas en el contenido de DNA. En el campo de la medicina esta técnica está siendo utilizada actualmente en el estudio de procesos patológicos cancerosos y precancerosos (Schajowicz et al., 1976).

La finalidad del trabajo desarrollado en esta sección fue determinar si B. retama posee el mayor contenido de DNA del género, como lo sugiere el gran tamaño de sus cromosomas. Estos resultados serán analizados conjuntamente con los demás datos obtenidos en el género y se discutirá la relación que existiría entre el contenido de DNA y la divergencia y evolución de las especies en el mismo.

VI.2.- Materiales y métodos

Se realizaron mediciones de contenido de DNA en 50 núcleos de células epidérmicas de hojas adultas, en cada uno de los individuos estudiados. Los materiales utilizados figuran en la tabla 15 como así también los valores medios y el error standard de cada uno de los individuos estudiados.

1) Preparación del material

Para la obtención de las epidermis se introdujo la punta de una hoja de afeitar por debajo de la misma levantando un pequeño trozo. Luego, con una pinza de punta fina se desprende una tira de epidermis del mayor tamaño posible evitando arrastrar el mesófilo. Todas las plantas fueron procesadas al mismo tiempo y en las mismas condiciones; en el caso de experimentos realizados en días diferentes se utilizó B. retama como control.

- a.- Fijación: se utilizó Carnoy modificado (3 partes de alcohol: 1 parte de ácido acético glacial) durante una hora a temperatura ambiente.
- b.- Hidrólisis: el tiempo de hidrólisis varía según se emplee ClH 1 N a 60°C o ClH 5 N a temperatura ambiente (25± 2°C). Actualmente, se utiliza más frecuentemente hidrólisis con ClH 5N a 25°C pues la hidrólisis en estas condiciones da como resultado una prolongación del período de máxima intensidad de

coloración, siendo mas lenta su caída. Además, los valores máximos del Feulgen son más altos que los encontrados con la hidrólisis convencional a 60°C (Deitch A. et al., 1968).

Para determinar el tiempo óptimo de hidrólisis en cada especie se dio a cada una de ellas los siguientes tiempos: a) 10', b) 20', c) 30', d) 40', e) 50', f) 60'. Se realizaron 20 mediciones en cada uno de los tiempos. En todas las especies, el valor promedio mas alto se obtuvo en 50 minutos a 25°C, siendo, por lo tanto, el tiempo de hidrólisis utilizado en todos los estudios realizados.

Posteriormente a la hidrólisis, se realizaron 3 lavados de 10-15' cada uno con agua destilada.

- c) Coloración: se colocó durante dos horas en reactivo de Schiff en oscuridad. La hidrólisis ácida mencionada en el paso anterior separa las purinas de las desoxipentosas dejando así liberados los grupos aldehídos. Estos aldehídos reaccionan con la fucsina ácida sulfurosa (reactivo de Schiff) dando un compuesto Feulgen-DNA insoluble de color rojizo. Esta reacción es específica para el DNA y ha sido muy importante para proveer información acerca de la localización precisa del DNA en las células. El pico de máxima absorción (mayor coloración) del compuesto Feulgen-DNA sería a los 550 m μ (Leuchtenberg, 1958).

Posteriormente, se realizaron tres lavados de 20' cada uno con agua sulfurosa (180 cc. de agua destilada, 10 ml de bisulfito de Na al 10%, 10 ml de ClH 1N).

- d) Montaje: las epidermis se montaron entre porta y cubre en medio de gelatina-glicerina (gelatina 50 gr., agua destilada 175 ml, glicerina pura 150 ml, fenol 7 gr.).

2) Mediciones microespectrofotométricas

El principio básico de la microespectrofotometría en la reacción de Feulgen consiste en el análisis cuantitativo de un compuesto coloreado (Feulgen-DNA) midiendo la cantidad de luz absorbida por ese compuesto. La aplicación del análisis fotométrico del complejo colorante-DNA es válido para la determinación cuantitativa del DNA si se cumplen dos principios fundamentales (Leuchtenberg, 1958):

- 1.- Que la relación entre DNA y el complejo Feulgen-DNA sea estequiométrica y reproducible, o al menos proporcional, es decir, que un aumento en el DNA se traduzca en un aumento directamente proporcional a la cantidad de coloración.
- 2.- Que la absorción de luz monocromática del complejo colorante-DNA siga la ley de Lambert-Beer en la que:

$$E = k \cdot c \cdot d$$

siendo

$$E = \log_{10} \frac{I_0}{I} = \text{extinción};$$

k = coeficiente de extinción específico;

d = espesor del material absorbente;

c = concentración de la sustancia absorbente.

Varios autores han llegado a la conclusión de que existe una buena correlación entre E y la concentración del complejo colorante-DNA y que la relación entre éste y el DNA es estequiométrica y perfectamente reproducible en los núcleos celulares (Leuchtenberg, 1958; Gimenez, 1977).

La cuantificación microespectrofotométrica fue realizada en un microespectrofotómetro Cytoscan Zeiss, utilizando el método "scanning", o sea, se miden todos los puntos del espécimen y luego éstos son integrados electrónicamente, obtenién-

dose así la extinción total. Para ello se utilizó una platina automática que se desplaza en dos ejes, x e y, de acuerdo con un programa prefijado.

VI.3.- Resultados

En la tabla 15 se presentan las medias \pm el error standard del contenido de DNA en cuatro especies del género Bulnesia. Las medias se basan en medidas realizadas en 50 núcleos en cada uno de los individuos estudiados. Los resultados, expresados en unidades arbitrarias (U.A.) fueron graficados en histogramas de frecuencia (Fig. 16).

En un mismo individuo y, más específicamente, en una misma hoja, el DNA sería constante y la variabilidad observada en los histogramas estaría dada por el error del método. El patrón de DNA en tejidos normales estaría dado por el grado de proliferación del mismo (índice mitótico) y del porcentaje de poliploidía que posea dicho tejido. Si es mitóticamente activo poseerá células en distintos momentos del ciclo celular: G_1 (post-mitótico) en el cual la cantidad de DNA es diploide (2C), G_2 (premitótico) donde la cantidad de DNA está duplicada (4C) y un período S (síntesis) con valores intermedios entre G_1 y G_2 (Gimenez, 1977). Si se trabaja con un tejido con un índice mitótico alto, este hecho deberá ser tenido en cuenta, pues sino se vería modificado el valor de DNA diploide real. Midiendo un número elevado de núcleos pueden separarse ambas curvas (2C y 4C) utilizando métodos estadísticos (Edwards et al., 1974). Las raíces tienen, en general, un índice mitótico elevado. Las hojas adultas, en cambio, poseerían un índice mitótico bajo y esto representaría una ventaja por los motivos ya expuestos.

El porcentaje de células presuntamente poliploides en los individuos estudiados es bajo (Fig. 16). En B. retama se observó una célula poliploide con un valor de 5.2 que no figura en el histo-

grama. Como se presumía, no se han observado células en división en la epidermis de las hojas de los individuos estudiados. Se podría suponer, entonces, que la mayoría de las células estudiadas se encuentran en G_1 . Las células presentemente poliploides no fueron consideradas al realizar la media de cada individuo.

Los principales resultados obtenidos son (Tabla 15):

- 1.- Las medias del contenido de DNA de los dos individuos estudiados de B. retama (número de cult. 408-2, $\bar{X} = 2.36$ y 423-1, $\bar{X} = 2.53$) no presentan diferencias estadísticamente significativas (Test "t", nivel de significación 5%). Entre los dos individuos estudiados de B. foliosa (número de cult. 406-1, $\bar{X} = 0.624$; número de cult. 406-2, $\bar{X} = 0.634$) no existen diferencias estadísticamente significativas (Test "t", nivel de significación 5%).
- 2.- Entre el contenido de DNA de las tres especies diploides: B. retama ($\bar{X} = 2.44$), B. foliosa ($\bar{X} = 0.63$) y B. sarmientoi ($\bar{X} = 0.44$) existe una diferencia estadísticamente significativa (Análisis de la varianza, test "t", nivel de significación 5%). B. retama posee casi cuatro veces más DNA que B. foliosa.
- 3.- La especie tetraploide B. bonariensis posee un contenido de DNA ($\bar{X} = 1.41$) distinto al encontrado en las especies diploides B. retama, B. foliosa y B. sarmientoi. Esta diferencia es estadísticamente significativa (Test "t", Análisis de la varianza, nivel de significación 5%). Dicho contenido de DNA es menor al encontrado en B. retama y cerca del doble que el de B. foliosa.
- 4.- B. sarmientoi poseería el menor contenido de DNA de las especies estudiadas. Su contenido de DNA ($\bar{X} = 0.44$) es menor que el encontrado en B. foliosa ($\bar{X} = 0.63$) siendo esta diferencia estadísticamente significativa (Test "t", nivel de significación 5%). Para confirmar esta afirmación sería necesario el estudio de mas individuos de esta especie.

TABLA 15.- Contenido de DNA (expresado en unidades arbitrarias)
de varias especies de Bulnesia

Espece	Nº de cult.	Nº cromosómico (2n)	Contenido de DNA $\bar{X} \pm E.S.$
<u>B. sarmientoi</u>	305-2	26	0.44 \pm 0.020
<u>B. foliosa</u>	406-1	26	0.624 \pm 0.032
" "	406-2	26	0.634 \pm 0.026
<u>B. retama</u>	423-1	26	2.53 \pm 0.089
" "	408-2	26	2.36 \pm 0.055
<u>B. bonariensis</u>	418	52	1.41 \pm 0.053

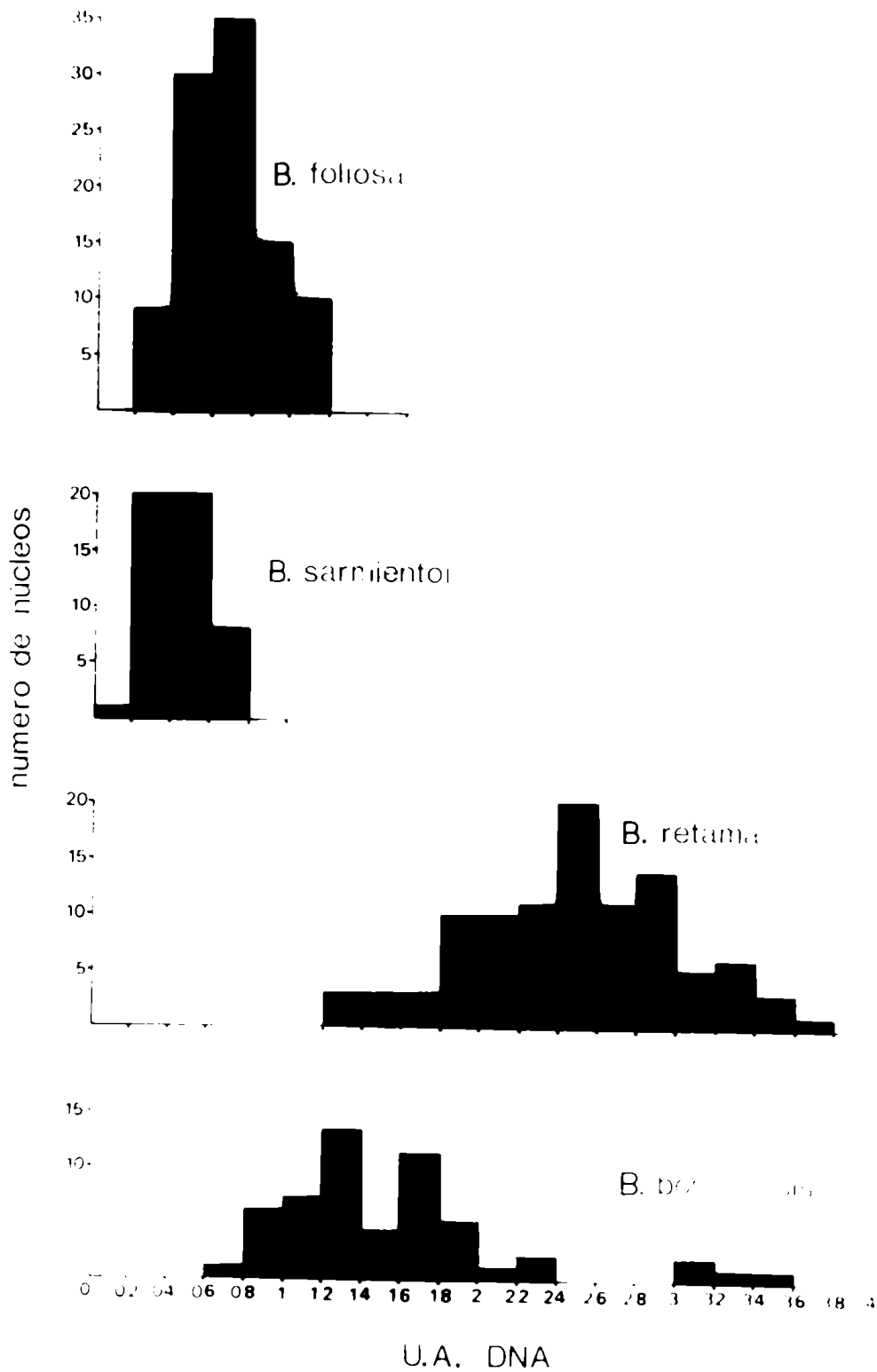


Figura 16.- Histograma de frecuencia del contenido de DNA, expresado en unidades arbitrarias (U.A.), en cuatro especies del género Bulnesia.

VII.- DISCUSION

VII.1.- Estudios citológicos en *Bulnesia* y géneros afines

El género Porlieria era considerado disyunto entre Norte y Sud América pero según Porter (1974) debería ser excluído de la lista de disyunciones trópicales, dado que Porlieria angustifolium (Engelm.) Gray (Texas, N.E. de México) sería más similar a Guaiaacum coulteri Gray y Guaiaacum unijugum T.S. Brandeg que a las especies sudamericanas de Porlieria. Ambos géneros están muy relacionados y podrían ser congénéricos (Porter, 1972). Porlieria microphylla (Baill.) Desc., O'Don. y Lourt. (Argentina, Bolivia, Perú, Paraguay, Uruguay) sería tetraploide con un número básico $x = 13$ para la localidad indicada en la Tabla 1. Es de interés en el futuro estudiar las especies sudamericanas de este género para determinar las relaciones que existen entre ellas y con otros géneros del grupo, especialmente con Guaiaacum. Guaiaacum officinale tendría $2n = ca. 26$.

Bulnesia es un género sudamericano que presenta disyunción entre el Norte y el Sur de Sudamérica. B. arborea (Colombia y Venezuela) y B. carrapo (Colombia) se encuentran en la parte norte de Sudamérica, mientras que las seis especies restantes son de la parte sur: B. sarmientoi Lor. ex Griseb. (Argentina, Bolivia, Paraguay), B. bonariensis (Argentina, Bolivia, Paraguay), B. foliosa (Argentina, Bolivia, Paraguay), B. schickendantzii (Argentina), B. retama (Argentina, Perú) y B. chilensis C. Gay. Esta última especie no ha sido aún investigada citológicamente; las restantes, excepto B. bonariensis, son diploides. El número básico de este género es $x = 13$ (Tabla 1). Engler admite que las especies venezolano-colombianas y las argentinas deben provenir de otras desaparecidas, porque le parece imposible que unas se hayan originado de las otras por hallarse tan lejos (citado por Descole et al., 1940).

Las especies de Bulnesia estarían muy diferenciadas morfológicamente, con excepción de B. arborea y B. carrapo que estarían más relacionadas. La hibridación parece no haber jugado un papel muy importante en este grupo ya que no se han hallado aún híbridos naturales entre ninguna de las especies del género Bulnesia (Hunziker, en preparación).

Solbrig (1972) opina que el género es de origen tropical y que la especiación habría ocurrido en el Chaco y áreas adyacentes en Sudamérica. Porter (1974) piensa que B. arborea y B. carrapo serían los representantes actuales de los progenitores tropicales que habrían originado a las especies del Sur de Sudamérica, destacando además, la adaptación a la dispersión por el viento que presentan los frutos alados de Bulnesia. El antecesor inmediato a las especies del Sur habría alcanzado el área donde viven actualmente por cortos saltos entre habitats semiáridos (Porter, *ibid.*).

B. retama presenta los cromosomas de mayor tamaño, lo que se debería a un mayor contenido de ADN (cfr. sección III y VI). El mayor contenido de ADN y la asimetría de su cariotipo se correspondería con una mayor especialización y adaptación a ambientes áridos, dado que B. retama es la especie más xerofila del género (Solbrig, 1972) y, probablemente, la xerofita arbustiva más extrema en la Argentina (Hunziker, com. verbal).

El género Plectrocarpa es estrictamente sudamericano (Argentina) y presenta también un número básico $x = 13$. Este género, junto con Metharme (monotípico, Chile) están muy relacionados con Larrea. Según Engler (1896) podrían ser consideradas como derivaciones tempranas de un tipo ancestral de Larrea (citado por Hunziker, 1975). Larrea tiene cuatro especies en Sudamérica y, por lo menos, una en Norteamérica y es un buen ejemplo de distribución disyunta anfitropical. Se han presentado evidencias acerca del origen sudamericano de este género y su posterior migración a Norteamérica

(Hunziker et al., 1969; Hunziker et al., 1972, 1973, en prensa; Hunziker, 1975). Porter (1974) opina que Larrea es muy similar (en términos de flores y frutos) a Sericodes greggii. Este último género es monotípico y endémico en Norteamérica (desierto de Chihuahua, N.E. de México). Porter (ibid.) siguiendo a Turner (1973) sugiere un origen norteamericano para el género Larrea con la subsecuente dispersión a Sudamérica. Los resultados citológicos del presente trabajo indican que Sericodes ($2n = 30$; $x = 15$) no parece estar muy relacionado con Larrea ($x = 13$). La relativa similitud morfológica entre estos dos géneros puntualizada por Porter (ibid.) podría deberse a convergencia evolutiva.

Pintoa chilensis es un género monotípico chileno y presenta $2n = 20$ con un número básico $x = 10$.

Sisyndite es un género nativo de Sudáfrica. Recuentos previos indicaron $2n = \text{ca. } 20-22$ (P. Raven, comunicación personal). En nuestros recuentos hemos determinado que posee $2n = 20$ con un número básico $x = 10$. Los cromosomas son pequeños y no ha sido posible aún determinar su cariótipo, pero, como fue mencionado en los resultados, es frecuente que el par mayor m presente su centrómero distendido y esta sería la causa de que a veces se cuenten 22 cuerpos. Si bien el número cromosómico de esta especie coincide con el de Pintoa chilensis los cromosomas de esta última son significativamente de mayor tamaño (Figs. 1 G-H).

El número básico postulado para Sericodes ($x = 15$) en este trabajo no ha sido hallado aún en ningún otro género de Zygophyllaceae, mientras que $x = 10$ que presentan Pintoa chilensis y Sisyndite sp. estarían sólo presentes en los géneros Fagonia y Zygophyllum de la misma subfamilia. El número básico $x = 13$ (Bulnesia, Guaiacum, Larrea, Plectrocarpa y Porlieria) estaría presente también en la subfamilia Chitonoideae, donde Porter (1963) contó $n = 13$ en Viscainoa gemiculata var. pinnata I.M. Johnston.

VII.2.- Citoespectrofotometría

Se ha estudiado el contenido de DNA en las especies diploides B. sarmientoi, B. foliosa, B. retama y B. bonariensis, que sería tetraploide (Tabla 15, Fig. 16).

B. retama, que es la especie mas xerófila del género y quizás la xerofita arbustiva mas extrema de la Argentina (Hunziker, comunicación verbal) presenta una diferencia significativa en el contenido de su DNA cromosómico con respecto a las demás especies estudiadas. La variación encontrada entre B. foliosa y B. retama es equivalente a la que existiría entre un diploide y un octoploide. B. bonariensis que sería tetraploide ($2n = 52$) presenta un contenido de DNA que si bien es aproximadamente el doble del valor encontrado en B. foliosa, no alcanza al encontrado en B. retama, siendo aproximadamente la mitad de éste.

Como ya ha sido mencionado en la introducción a este tema (sección VI.1.-), se han encontrado en otros grupos variaciones en un mismo nivel de ploidía en especies de un mismo género (Jones and Rees, 1968; Rees et al., 1966; Martin and Shanks, 1966); ocasionalmente puede ocurrir que los poliploides contengan menor contenido de DNA que sus antecesores diploides (Rees, 1972; Dowrick and El Bayoumi, 1969). En consecuencia, el número cromosómico básico no es una guía acerca de la cantidad de DNA nuclear y la inversa tampoco sería válida, es decir, que la cantidad de DNA no puede ser usada por sí sola, para determinar el número cromosómico, pues, en el caso de B. retama se le hubiera asignado una ploidía de aproximadamente $8x$, mientras que, por recuentos mitóticos y meióticos, se sabe que es diploide.

La poliploidía es escasa en el género Bulnesia, pues solamente estaría B. bonariensis con un nivel superior al diploide (cfr. sección III). Una de las condiciones importantes postuladas por Grant (1971) para que exista poliploidía es que ocurra con frecuen-

cia hibridación interespecífica natural, lo que implicaría la existencia de barreras de aislamiento débiles entre las especies. En la naturaleza no se han encontrado híbridos naturales entre las especies de Bulnesia (Crisci et al., en preparación), esto justificaría, en parte, la escasez de poliploides en el género.

El aumento significativo del contenido de DNA observado en B. retama con respecto a las otras especies estudiadas del género jugaría un papel equivalente, dentro del proceso de especiación, a la poliploidía. Si se comparan ambos procesos desde un punto de vista genético se ve que los cambios en el material cromosómico asociados con poliploidía lo hacen a expensas de incremento en el número de grupos de ligamiento, en cambio, en los que no están asociados a poliploidía el número de grupos de ligamiento permanece inalterado (Rees et al., 1966). Esto es adaptativamente importante puesto que el aumento en el número de grupos de ligamiento produce un aumento de variabilidad que resulta en segregación y recombinación de genes y, en algunos casos, podría ser desventajosa la producción de segregantes de poco valor adaptativo (Stebbins, 1966). Es posible, entonces, que el aumento en el contenido de DNA en B. retama haya sido un proceso que produjo gran valor adaptativo. Existen otros ejemplos donde no existe poliploidía y las especies difieren notablemente en el contenido de DNA. Miksche y Hotta (1973) dicen que las gimnospermas estarían "programadas genéticamente para excluir poliploidía y favorecer la redundancia intracromosómica". En la filogenia de las gimnospermas el mecanismo que operaría sería una acumulación de secuencias repetidas en varios loci génicos a lo largo del cromosoma. En el género Vicia (Martin and Shanks, 1966) la poliploidía es rara y esto es explicado por la existencia de polinemia.

Es difícil imaginar que el incremento en el contenido de DNA de B. retama haya ocurrido en un solo paso. Lo más probable es que dicho incremento haya tenido ventaja selectiva y como conse-

cuencia de selección repetida para este evento, haya alcanzado el valor de DNA que posee actualmente. Como fue mencionado por Hunziker (en Crisci et al., en preparación) esta especie poseería varias adaptaciones histofisiológicas. Estas adaptaciones podrían haberse formado en varios pasos que no serían simultáneos y que podrían, quizás, coincidir con los sucesivos aumentos en el contenido de DNA lo que pudo haber permitido, probablemente, la colonización de habitats más áridos.

Se encuentran en realización estudios de distribución geográfica de las especies del género Bulnesia (Palacios y Hunziker, en preparación). Si se comprobara que B. retama ocupa habitats mas templados que el resto de las especies, esto coincidiría con lo enunciado por Stebbins (1966) de que habría una correlación entre contenido de DNA y adaptación climática, dado que en Gramíneas, Liliales y Leguminosas se vió que los géneros con cromosomas grandes se encuentran en climas templados y los que tienen cromosomas medianos o pequeños se relacionarían con climas tropicales o subtropicales.

Entre las especies diploides B. foliosa y B. sarmientoi existe una diferencia (Fig. 16; Tabla 15) que deberá ser confirmada mediante el estudio de más individuos de B. sarmientoi, para determinar la variabilidad intraespecífica que existe en esta especie. De todas maneras, no es de extrañar que las diferencias en el contenido de DNA entre estas especies sean relativamente pequeñas, puesto que por debajo de un contenido mínimo el DNA no es eliminado fácilmente. Estudios realizados en peces demostraron que hay una diferencia significativamente pequeña en el contenido de DNA entre miembros de familias que tienen bajo contenido de DNA (Hinegardner, 1976).

B. sarmientoi poseería, probablemente, el menor contenido de DNA del grupo estudiado. Es una especie arborea, especializada mor

foliologicamente con una extrema reducción en el número de foliolos, carpelos, tamaño de hojas y flores, etc. y sería la más aislada de todas las especies (Crisci et al., en preparación). Es probable que en este caso haya habido reducción filogenética en el tamaño cromosómico y el contenido de DNA. Este proceso se ha encontrado en varios géneros, tales como Crepis, Muscari, Haplopappus (Stebbins, 1966).

La evolución, en ausencia de aumento de DNA, se caracteriza por pérdida de partes, pérdida de DNA y especialización (Hinegardner, 1976). Si el valor adaptativo de las duplicaciones en ciertos locus se reduce, éstos pueden ser perdidos (Stebbins, 1971). El menor contenido de DNA hallado en B. sarmientoi, especializada morfológicamente, coincidiría con la observación de que un bajo contenido de DNA se correlacionaría con especialización en muchos grupos de organismos (Hinegardner, 1976; Stebbins, 1966).

Por otro lado, B. retama, como se dijo, también puede considerarse como especializada en cuanto a varias características histofisiológicas. En este caso, por lo tanto, un aumento del contenido de DNA también se encuentra correlacionado con especialización en un sentido amplio del término. El mayor valor adaptativo de ciertos locus habría llevado a que por medio de selección repetida se obtengan duplicaciones o nuevas funciones enzimáticas que le habrían permitido a B. retama ocupar habitats más áridos que el resto de las especies (con excepción de B. chilensis que no ha sido estudiada aún y ocupa habitats similares a los de B. retama). En el género el tamaño medio de los cromosomas es relativamente pequeño y esto se extendería a otros géneros relacionados de la misma familia (Larrea, Plectrocarpa, Porlieria, Sericodes). Por lo tanto, resulta difícil pensar que el aumento del contenido de DNA en B. retama implique secuencias sin sentido, sin valor adaptativo.

Las especies del Norte, B. arborea y B. carrapo y la argentina B. bonariensis formarían un grupo primitivo (Crisci et al., en preparación).

En algunos grupos como en helechos, las especies primitivas tienen mayor contenido de DNA (Hinegardner, 1976). En Bulnesia esto no sería así, pues, si bien no se han realizado aún estudios de contenido de DNA en B. arborea y B. carrapo éstas poseen cromosomas pequeños y B. bonariensis que sería tetraploide posee aproximadamente la mitad del contenido de DNA que la especie diploide B. retama.

Basándose en la asimetría del cariótipo observada en B. retama con respecto a otras especies diploides estudiadas (cfr. Cap. III) podría suponerse que el aumento de DNA en esta especie ha ocurrido por duplicación longitudinal de segmentos cromosómicos y no por polinemia diferencial. Por supuesto, no se excluye la posibilidad de que ambos procesos hayan actuado simultáneamente. La disminución del contenido de DNA que habría ocurrido al originarse B. sarmientoi resulta fácilmente explicable si se tiene en cuenta la hipótesis de los cambios longitudinales de segmentos cromosómicos.

En consecuencia, en la evolución de las especies del género Bulnesia se habría producido incremento y disminución del contenido del DNA nuclear.

VII.3.- Cromatografía de compuestos fenólicos en los géneros Bulnesia, Porlieria y Plectrocarpa.

El estudio de los compuestos fenólicos secundarios en plantas ha sido muy útil en la clasificación de taxones. En el género Bulnesia han permitido diferenciar las especies a través de sus perfiles cromatográficos.

B. foliosa se caracteriza por poseer los compuestos 1, 2 y 3; los compuestos a, b y c representarían variabilidad intraespecífica. Aunque los compuestos 1, 2 y 3 se encuentran también en otras especies y géneros afines (Porlieria y Plectrocarpa), B. foliosa no presenta otros compuestos de presencia constante aparte de éstos (Tabla 3; Figs. 5 y 9).

B. arborea presentaría dos linajes, uno en Colombia y otro en Venezuela; aunque están separados por 3000 km no existen diferencias significativas entre ellas. Ambas razas poseen los compuestos marcadores 1, 2, 3, 4 y 5; e, o y p representarían variabilidad intraespecífica (Tablas 4 y 5, Figs. 6 y 9). En el linaje de Venezuela, el compuesto 2 se presentó en la mayoría de los individuos en menor concentración que en el de Colombia; inversamente, en los individuos que poseen el compuesto o éste se presenta con mayor concentración en el linaje de Venezuela que en el de Colombia. Concomitante con un aumento en la concentración de o hay una disminución en la concentración de 5, lo que indicaría que ambos compuestos tendrían un camino biosintético común y una alteración en el mismo produciría aumento en la concentración de un compuesto en detrimento del otro.

B. carrapo posee los compuestos 1, 2, 3 y 6 en todos los individuos estudiados (Tabla 6; Figs. 6 y 9). Es probable que el compuesto 6 sea el mismo que o que aparece en algunos individuos de B. arborea, esto sólo podrá ser confirmado mediante análisis químico.

B. bonariensis, a diferencia de las anteriores no posee el compuesto 3. Posee los compuestos 1, 2, 6 y 7 en todos los individuos estudiados (Tabla 7; Figs. 7 y 9). Los compuestos a y d representarían variabilidad intraespecífica; por la posición, color en U.V. con y sin exposición a vapores de amoníaco el compuesto a observado en B. bonariensis sería el mismo que se encuentra en B. foliosa.

B. schickendantzii posee los compuestos 1, 2, 3, 7, 8 y 9; f y g representarían variabilidad intraespecífica (Tabla 8; Figs. 5 y 9).

Es interesante notar que de los nueve compuestos mencionados (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9) sólo cuatro son característicos de dos especies: 4 y 5 de B. arborea, 8 y 9 de B. schickendantzii. Sin

embargo, son fácilmente caracterizables las cinco especies mencionadas porque en cada una de ellas se dan combinaciones diferentes de los compuestos estudiados.

B. sarmientoi presenta solamente un compuesto, 3, en común con las especies anteriores. Los demás son compuestos que difieren de los ya mencionados por la posición, color en U.V., con y sin exposición a vapores de amoníaco. Se realizó cromatografía superpuesta de B. sarmientoi con B. schickendantzii y se comprobó que había superposición solamente del compuesto 3, si bien no es una prueba definitiva ya que podría tratarse de dos compuestos diferentes con el mismo Rf, puede suponerse que B. sarmientoi posee el compuesto 3 en común con las especies mencionadas anteriormente, con excepción de B. bonariensis que no lo posee. Los compuestos 14, 15, 16, 17 y 18 son exclusivos o "marcadores" de esta especie. 17 podría ser 1 en muy baja concentración pero se prefiere mantenerlo como un compuesto separado, pues dado que 1 está en alta concentración en las cinco especies mencionadas con anterioridad, el hecho de que 1 y 17 se superpongan en el cromatograma "suma" de B. sarmientoi y B. schickendantzii podría deberse a un "arrastré" de 17 por parte de 1 debido a la alta concentración de este último. Los compuestos k, l, m y n representarían variabilidad intraespecífica (Tabla 10; Figs. 7 y 9).

En B. retama se observó la presencia de cuatro compuestos marcadores 10, 11, 12 y 13; h e i representarían variabilidad intraespecífica (Tabla 9; Figs. 8 y 9). Esta especie pierde sus hojas tempranamente y los estudios fueron realizados en troncos delgados. Con el fin de que los resultados encontrados sean comparables con los obtenidos en las demás especies, se obtuvieron hojas de dos individuos jóvenes que se encuentran en cultivo. En éstos se encontraron los compuestos 10, 11, 12 y j. La ausencia del compuesto 13 y porcentaje de aparición de j en hojas podrá ser comprobado con el estudio de individuos jóvenes que aún no hayan perdido sus hojas,

pero, esencialmente los cromatogramas de hoja y de tallo son muy semejantes. A fin de comprobar fehacientemente que B. retama no posee los compuestos 1, 2 y 3, se realizó cromatografía superpuesta sembrando en el mismo origen B. retama y B. foliosa, observándose que no hay coincidencia de ningún compuesto (Figs. 8 y 9).

En algunos casos se sembró rutina como testigo y ésta coincidió con 1 en su posición en ambos solventes y color a luz U.V., con y sin amoníaco. Este compuesto es de amplia difusión en el reino vegetal y lo poseerían en alta concentración B. foliosa, B. schickendantzii, B. bonariensis, B. carrapo y B. arborea. Si 17 es rutina B. sarmientoi lo poseería en muy baja concentración y estaría ausente en B. retama.

Del análisis de los perfiles cromatográficos se podría deducir que las especies del Norte, B. arborea y B. carrapo son bastante afines entre sí. De las especies del Sur, B. bonariensis, B. foliosa y B. schickendantzii estarían bastante relacionadas entre sí y con las especies del Norte. B. retama y B. sarmientoi, en cambio, estarían bastante aisladas con el resto de las especies y entre sí. Hay varios compuestos comunes a más de un taxón lo cual indicaría la existencia de sistemas metabólicos similares. Es interesante destacar que, en el caso de que 0 y 6 sean un mismo compuesto, éste aparecería en B. arborea (Como variación intraespecífica), B. carrapo y B. bonariensis. Las dos primeras especies son muy afines morfológicamente (Hunziker et al., en preparación); B. bonariensis es la especie argentina que mayor similitud presenta con ellas en cuanto al tamaño de sus flores y frutos (Hunziker et al., en preparación).

Debido a que el número de compuestos analizados en estas cinco especies no es muy elevado, ya que sólo son nueve los compuestos que en diversas combinaciones nos permiten diferenciarlas, no es conveniente establecer relaciones entre ellas solamente en base a los datos cromatográficos.

La presencia de uno o varios compuestos químicos "marcadores" o "diagnósticos" de una especie indican la existencia de genes marcadores específicos. Si bien en este caso el número de genes en consideración no es muy elevado nos permite delimitar las siete especies y establecer similitudes y diferencias significativas.

Técnicas de taxonomía numérica aplicadas a los resultados cromatográficos obtenidos mostrarían la existencia de tres grupos fenéticos: uno constituido por B. arborea, B. carrapo, B. bonariensis, B. schickendantzii y B. foliosa; otro por B. sarmientoi y el último por B. retama (cfr. sección VII.4.-).

Plectrocarpa tetracantha y Porlieria microphylla poseen los compuestos 1, 2 y 3 en común con el género Bulnesia. Además, ambos poseen el compuesto 21, siendo 22 y 23 característico de Plectrocarpa tetracantha y 24 de Porlieria microphylla. Los compuestos 19 y 20, detectados al modificar el primer solvente, serían comunes a ambos géneros.

Porlieria chilensis poseería, aparentemente, los mismos compuestos que P. microphylla pero esto sólo será comprobado con el estudio de un mayor número de individuos de la especie chilena.

Mabry et al. (1977) ha realizado un extensivo estudio de glicósidos y agliconas de flavonoides en el género Larrea. Los compuestos analizados en Bulnesia, Porlieria y Plectrocarpa no han sido aún identificados y el método de trabajo empleado por Mabry et al. (ibid.) no es comparable con el aquí utilizado, por lo que se realizaron unas pocas cromatografías en algunos individuos en las especies del género Larrea para visualizar la existencia de compuestos comunes con los estudiados en las otras Zygophyllaceas. Aparentemente, los compuestos 1, 2 y 3 estarían presentes en Larrea. Dichos compuestos podrían ser, por lo tanto, indicadores importantes en el estudio de relaciones supragenéricas. Esto deberá ser confirmado con el estudio de todos los géneros de la subfamilia Zygophylloideae,

para establecer si dichos compuestos son de distribución general dentro de la subfamilia (o familia) o si el análisis de los mismos ayudaría a definir y establecer una clasificación más natural de la subfamilia Zygophylloideae.

VII.4.- Quimiotaxonomía numérica en el género Bulnesia

Para la evaluación numérica e interpretación de los resultados obtenidos, mediante estudios de cromatografía de compuestos fenólicos en hojas, se emplearon técnicas de taxonomía numérica. Estos resultados generan hipótesis que deberán compararse con los demás datos obtenidos en el género.

Para representar el grado de similitud entre cada par posible de OTU's (especies), se utilizaron tres coeficientes de asociación distintos. Los coeficientes "simple matching" y de "Rogers y Tanimoto" toman en consideración los estados positivos de los caracteres, es decir, aquellos que ocurren en los dos taxones comparados, los que ocurren en un taxon pero no en el otro y los estados negativos, o sea, los que están ausentes en ambos taxones comparados. Tratándose de compuestos químicos la ausencia de un compuesto en dos taxones podría deberse a que a ambos les falta el mismo sistema enzimático; visto bajo este punto de vista los caracteres en estado negativo son muy útiles en la apreciación de similitudes entre dos OTU's diferentes. En el coeficiente de Jaccard, en cambio, los estados negativos de los caracteres no tienen importancia. En el caso especial del género Bulnesia, se obtienen coeficientes de valor cero para una especie (B. retama) cuando se utiliza este coeficiente de asociación. El valor "cero" no tiene significado taxonómico o evolutivo pues podrían tratarse de dos entidades muy alejadas o, como en este caso, de dos especies de un mismo género. Debido a este hecho se consideró que, en este caso en particular, la informa-

ción dada por los coeficientes "simple matching" y de "Rogers y Tanimoto" se acercaría más a la relación de similitud que existiría entre los taxones estudiados.

Los coeficientes de correlación y distancia permiten trabajar con caracteres con más de dos estados, o sea, los que pueden estar presentes y/o ausentes en una especie determinada.

La representación de los resultados de taxonomía numérica se realizó mediante la confección de fenogramas. Debido a su aspecto rectangular se asemejan a árboles filogenéticos pero es de interés recordar que se basan exclusivamente en evidencias fenéticas. La semejanza entre dos OTU's o grupos de OTU's está indicado por el valor del coeficiente de similitud que coincide con el punto de unión de los OTU's comparados.

Como ya fue mencionado en los resultados se postularían, con los distintos métodos utilizados, tres grupos fenéticos dentro del género: el primero integrado por B. foliosa, B. carrapo, B. arborea, B. bonariensis y B. schikendantzii, otro integrado por B. retama y el último integrado por B. sarmientoi.

La confrontación de las hipótesis obtenidas a través de estos estudios con todos los datos conocidos en el género permitirán comprobar la utilidad de los resultados obtenidos mediante cromatografía de compuestos fenólicos para el análisis de las relaciones dentro del género Bulnesia.

Bulnesia retama es un arbusto que, como resultado de varias especializaciones histofisiológicas, muestra una adaptación extrema a condiciones áridas (tallos fotosintéticos, recubiertos de cera, que pierden sus hojas tempranamente antes de la floración) (Crisci et al., en preparación). Es la xerofita arbustiva mas extrema en la Argentina (Hunziker, comunicación verbal), es diploide ($2n = 26$) y posee los cromosomas más grandes, el cariótipo mas asimétrico y el mayor contenido de DNA dentro del género (cfr. sección III y VI).

B. sarmientoi es una especie arborea, morfológicamente especializada con una extrema reducción en el número de carpelos (3),

folíolos (2), tamaño de hojas y flores, etc. (Hunziker, en preparación). Es diploide ($2n = 26$) y poseería los cromosomas más pequeños y el menor contenido de DNA del género (cir. sección III y IV).

Las especies del Norte de Sudamérica B. arborea (Colombia, Venezuela), B. carrapo (Colombia) y B. bonariensis (Argentina) formarían un grupo primitivo multifoliolado. B. foliosa y B. schickendantzii, conjuntamente con B. retama y B. chilensis serían más evolucionadas (Hunziker, en preparación).

Técnicas de taxonomía numérica aplicadas a los estudios morfológicos mostraron tres pares de taxa muy relacionados: B. arborea-B. carrapo, B. foliosa-B. schickendantzii y B. retama-B. chilensis. B. bonariensis ocuparía una posición intermedia entre las especies del Norte (B. arborea-B. carrapo) y el grupo de especies del Sur. B. sarmientoi ha sido, en todos los casos, la especie más remota y aislada. B. retama y B. chilensis serían los taxa más especializadas y, probablemente, ambas sean subespecies de una sola especie (Crisci et al., en preparación).

Las técnicas de taxonomía numérica aplicadas a los resultados de cromatografía de compuestos fenólicos coinciden con los datos morfológicos en cuanto al establecimiento de B. retama y B. sarmientoi como dos entidades bastante aisladas del resto de las especies y entre sí. Las relaciones entre las especies restantes no se evidencian con claridad quedando incluidas en un único grupo; esto se debe, principalmente, al bajo número de compuestos que las caracteriza, pues son sólo nueve los que, en distintas combinaciones, permiten diferenciarlas. Desde un punto de vista biológico este hecho puede llevar a errores sistemáticos que son posibles de corregir teóricamente. Nuevamente surge, con este ejemplo, la necesidad de trabajar con un conjunto de datos de diverso origen para la elaboración de una clasificación natural.

Es interesante destacar que, en el género Bulnesia, los compuestos fenólicos han sido de gran utilidad pues han permitido sepa

rar cromatográficamente las especies y determinar, independientemente del resto de la información obtenida, una posición aislada de B. sarmientoi y B. retama, lo que coincide ampliamente, principalmente en la última especie, con los demás datos obtenidos en el género.

VIII.- CONCLUSIONES

De los géneros que constituyen la subfamilia Zygophylloideae, Larrea ha sido uno de los más estudiados. Este género constituye un caso muy interesante de distribución disyunta anfitropical cubriendo regiones semidesérticas de Argentina, Chile, Bolivia, Perú, México y S.W. de Norteamérica. La sección Larrea agrupa a las especies diploides ($x = 13$; $2n = 26$) L. nitida (Chile, Argentina) y L. ameghinoi (Argentina) y la sección Bifolium esta constituida por el tetraploide ($2n = 52$) L. cuneifolia (Argentina) y el complejo L. divaricata (Palacios y Hunziker, 1972). Este último tiene una distribución disyunta con, por lo menos, dos taxones que han sido reconocidos como diferentes especies (L. divaricata Cav. (Sudamérica) y L. tridentata (Sesse et Moc. ex DC) Peulg. et Lowe (Norteamérica), o como diferentes subespecies de una especie anfitropical (L. divaricata subsp. divaricata y L. divaricata subsp. tridentata (Sesse et Moc. ex DC) Peulg. et Lowe.

El taxon norteamericano consta de tres citotipos: diploide, tetraploide y hexaploide que habrían surgido por autopoliploidía intervarietal (Yang, 1967, 1968, 1970; Hunziker et al., 1977).

Existe hibridación natural entre las cuatro especies sudamericanas; en el Norte de la Patagonia donde conviven las cuatro especies, se han encontrado cinco híbridos interespecíficos que son intermedios en sus características morfológicas y químicas. La evidencia obtenida a través del estudio citológico del híbrido estéril entre L. cuneifolia y L. divaricata indica que L. divaricata o una especie muy relacionada con ésta ha sido uno de los progenitores del tetraploide L. cuneifolia. El apareamiento cromosómico regular y elevada fertilidad de los híbridos entre L. ameghinoi y L. nitida sugieren que ambos taxones están estrechamente relacionados y que pueden ser considerados como semiespecies parcialmente simpátricas, in

tegrando un singameon. Los genomios de L. divaricata y L. tridentata son homólogos puesto que el comportamiento de los cromosomas en el híbrido entre ambas especies es normal. El análisis de estos híbridos indican que L. divaricata y L. tridentata constituyen un caso límite entre especie y subespecie y que, por lo tanto, pueden ser consideradas como semiespecies alopátricas (Hunziker et al., 1969, 1972, 1973, 1977; Yang et al., 1977).

Con respecto al origen geográfico de Larrea se han esbozado varias hipótesis: Barbour (1969) sugiere, que la distribución disjunta de L. divaricata se habría originado por la evolución de los tipos de Chihuahua y Argentina a partir de un prototipo común trans tropical que se habría extinguido; Hunziker (1975), Hunziker et al. (1977) y Wells y Hunziker (1977) presentaron evidencias acerca del origen sudamericano de este género y su posterior migración a Norteamérica y Porter (1974) siguiendo a Turner (1973) sugiere un origen norteamericano para el género Larrea con la subsecuente dispersión a Sudamérica. Porter (ibid.) opina que Larrea es muy similar, en término de flores y frutos, a Sericodes greggii. Este último género es monotípico y endémico en Norteamérica (desierto de Chihuahua, N.E. de México). Este género posee, sin embargo, hojas simples y mericarpios pilosos, mientras que las especies primitivas de Larrea representadas actualmente por taxones como L. nitida tuvieron, probablemente, hojas multifolioladas y pubescentes y frutos indehiscentes (Hunziker, 1975; Hunziker et al., 1977). Por otro lado, los resultados citológicos del presente trabajo indican que Sericodes ($2n = 30$; $x = 15$) no estaría muy relacionado con Larrea cuyo número básico es $x = 13$ (sección III, VII.1.-). La relativa similitud morfológica entre estos dos géneros puntualizada por Porter se debería a convergencia evolutiva.

En la subfamilia Zygophylloideae existirían, según Porter (1974) ocho géneros relacionados en mayor o menor grado con Larrea. Estos son Sericodes, con distribución estrictamente norteamericana;

Guaiacum, que se extiende de Norte a Sudamérica a través de los trópicos; Bulnesia, Metharme, Porlieria y Plectrocarpa que son estrictamente sudamericanos y Sisyndite y Neoluederitzia que se distribuyen en el S.W. de Africa.

El género Plectrocarpa (Argentina) presenta un número básico $x = 13$ (sección III, VII.1.-). Este género, conjuntamente con Metharme (monotípico, Chile) están muy relacionados con Larrea y, según Engler (1896) podrían ser considerados como derivaciones tempranas de un tipo ancestral de Larrea.

Porlieria, que también es sudamericano (Porter, 1974) posee, al igual que Plectrocarpa y Larrea un número básico $x = 13$.

El género sudafricano Sisyndite posee un número básico $x = 10$, al igual que Pintoa chilensis (monotípico, Chile), si bien ambos géneros poseen el mismo número básico, Pintoa chilensis posee cromosomas de mayor tamaño (sección III, VII.1.-). Este género, conjuntamente con Guaiacum, Porlieria, Bulnesia, Morkillia y Viscainoa (estos dos últimos pertenecientes a la subfamilia Chitonioidae) formarían un grupo natural dentro de la familia (Porter, 1974).

Sobre la base de los números básicos mencionados podría suponerse una mayor relación entre el género Larrea con los sudamericanos Porlieria y Plectrocarpa que con Sericoges, Sisyndite y Pintoa.

El género Bulnesia, que presenta una distribución disyunta entre el Norte y el Sur de Sudamérica posee también un número básico $x = 13$, presentando probablemente, una relación bastante estrecha con los géneros Larrea, Porlieria y Plectrocarpa antes mencionados. Las especies del Norte de Sudamérica B. arborea y B. carrapo y las del Sur de Sudamérica: B. foliosa, B. retama, B. sarmientoi y B. schickendantzii son diploides ($2n = 26$); B. bonariensis (Argentina) sería tetraploide ($2n = 52$).

En este género la especiación primaria ocurre en Sudamérica pero, en contraste con Larrea, no se ha detectado hibridación ni mi

gración a Norteamérica (Hunziker et al., en preparación).

Este género sería de origen tropical, B. arborea y B. carra-po serían los representantes actuales de los progenitores tropicales que habrían originado a las especies del Sur de Sudamérica (Porter, 1974).

B. retama es la especie mas xerofita del género (Solbrig, 1972) y la xerofila arbustiva mas extrema en la Argentina (Hunziker, comunicación verbal); posee varias especializaciones histofisiológicas (hojas efímeras, afilia estacional, tejidos corticales con actividad fotosintética, epidermis con producción de ceras) que le permitirían la colonización de habitats más áridos (Crisci et al., en preparación). Esta especie posee los cromosomas de mayor tamaño lo que se debería a un mayor contenido de DNA. Por medio de mediciones citoespectrofotométricas se ha determinado, en el presente trabajo, que esta especie posee cuatro veces más DNA que la especie diploide B. foliosa y casi el doble que la tetraploide B. bonariensis (sección VI, VII.2.-).

Es difícil imaginar que el significativo incremento en el contenido de DNA de B. retama haya ocurrido en un solo paso, lo mas probable es que dicho aumento haya tenido ventaja selectiva y, como consecuencia de selección repetida para este evento, haya alcanzado el valor de DNA que posee actualmente. En este género la poliploidía es rara; probablemente, el aumento significativo de DNA observado en B. retama jugaría un papel equivalente a la poliploidía dentro del proceso de especiación.

Debido al pequeño tamaño de los cromosomas no se ha realizado estudios cariotípicos en todas las especies, pero se ha podido determinar que B. retama poseería un cariótipo más asimétrico que B. schickendantzii.

La asimetría del cariótipo, el mayor tamaño de los cromosomas y el mayor contenido de DNA observado en B. retama parecerían

concordar con una mayor adaptación y especialización a ambientes áridos.

B. sarmientoi, en cambio, poseería el menor contenido de DNA del grupo. Es probable que, en este caso, haya habido reducción filogenética en el tamaño cromosómico y en el contenido de DNA. Este hecho parecería concordar con lo observado por Crisci et al. (en preparación) de que esta especie arborea sería la más aislada del género, con una extrema especialización morfológica consistente en reducción en el número de folíolos, carpelos, tamaño de las hojas y de las flores, etc.

Ambas especies, B. retama y B. sarmientoi serían especializadas morfológicamente y poseerían los valores, máximos y mínimos del contenido de DNA del grupo. En el caso de B. retama, el mayor valor adaptativo de ciertos locus habría llevado a que por medio de selección repetida se obtuvieran duplicaciones o nuevas funciones enzimáticas que le habrían permitido ocupar habitats mas áridos que el resto de las especies.

En el género, el tamaño medio de los cromosomas es relativamente pequeño y esto se extendería a otros géneros relacionados de la misma subfamilia (Larrea, Plectrocarpa, Porlieria, Sericodes). Por lo tanto, resulta difícil pensar que el aumento del contenido de DNA en B. retama implique secuencias sin sentido, sin valor adaptativo.

Las especies del Norte de Sudamérica, B. arborea y B. carrapo y la argentina B. bonariensis formarían un grupo primitivo (Crisci et al., en preparación). En algunos grupos, como en helechos, las especies primitivas tienen el mayor contenido de DNA (Hinegardner, 1976). En el género Bulnesia no sería así, pues si bien no se han realizado aún estudios del contenido de DNA en B. arborea y B. carrapo, éstas poseen cromosomas pequeños y B. bonariensis, que sería tetraploide, posee aproximadamente la mitad del contenido de DNA que la especie diploide B. retama.

Sobre la base de la asimetría del cariótipo observada en B. retama con respecto a las otras especies diploides estudiadas, podría suponerse que el aumento de DNA en esta especie ha ocurrido por duplicación longitudinal de segmentos cromosómicos y no por polinemia diferencial. Por supuesto, no se excluye la posibilidad de que ambos procesos hayan actuado simultáneamente.

En consecuencia, en la evolución de las especies del género Bulnesia se habría producido incremento y disminución del contenido de DNA nuclear.

El estudio de los compuestos fenólicos en hojas mediante cromatografía bidimensional en capa delgada, permitió diferenciar las siete especies del género Bulnesia y establecer similitudes y diferencias significativas entre las mismas. En el género se estudiaron 37 compuestos que se diferencian entre sí por su posición relativa, color a la luz U.V. y el viraje de color que experimentan al ser expuestos a vapores de amoníaco bajo luz U.V..

En las especies B. foliosa, B. schickendantzii, B. bonariensis, B. arborea y B. carrapo hay varios compuestos comunes. Aunque el número de compuestos analizados no es muy elevado, las especies se identifican fácilmente en base a sus perfiles cromatográficos. La presencia de compuestos comunes a más de un taxon indicaría la existencia de sistemas metabólicos similares.

B. sarmientoi poseería sólo un compuesto en común con las cinco especies mencionadas mientras que B. retama no poseería ningún compuesto en común con las seis especies restantes (sección IV, VII.3.-).

Técnicas de taxonomía numérica aplicadas a los resultados de cromatografía de compuestos fenólicos mostraron la posible existencia de tres grupos fenéticos: uno constituido por B. arborea, B. carrapo, B. bonariensis, B. schickendantzii y B. foliosa; otro por B. sarmientoi y el último por B. retama (sección V, VII.4.-). Mediante técnicas de electroforesis de semillas (Comas y Hunziker,

1976), anatomía del leño (Cozzo, 1948) y morfología (Crisci et al., en preparación), se ha visto que las especies B. foliosa y B. schickendantzii poseen gran afinidad. Además, B. sarmientoi sería, en base a estudios morfológicos, la más remota y aislada de las especies (Crisci et al., en preparación). La anatomía del leño secundario indica que B. sarmientoi y B. retama poseen características anatómicas que apoyarían una posición aislada de ambas especies (Cozzo, 1948). Los resultados cromatográficos coinciden con los antes mencionados en cuanto al establecimiento de B. retama y B. sarmientoi como dos entidades bastante aisladas del resto de las especies y entre sí. En cambio, las relaciones entre las especies restantes no se evidencian con claridad, quedando incluidas en un único grupo; esto puede ser debido al pequeño número de compuestos (y por ende, genes) analizados.

Se han realizado estudios cromatográficos en las especies Porlieria microphylla, Porlieria chilensis y Plectrocarpa tetraantha. Estas especies poseen algunos compuestos comunes entre sí y con el género Bulnesia. Además, existen compuestos propios de cada una de las especies analizadas. Se realizaron algunas corridas cromatográficas en las especies sudamericanas del género Larrea y se vio que, utilizando el mismo método que en los géneros Bulnesia, Porlieria y Plectrocarpa, este género poseería compuestos en común con los mencionados.

Los compuestos que son comunes a los géneros Bulnesia, Porlieria, Plectrocarpa y Larrea podrían ser indicadores importantes en el estudio de relaciones supragenéricas. Sería interesante confirmar dicha hipótesis estudiando los perfiles cromatográficos de todos los géneros de la subfamilia Zygophylloideae para establecer si dichos compuestos son de distribución general dentro de la subfamilia (o familia) o si el análisis de los mismos ayudaría a definir y establecer una clasificación más natural de la subfamilia Zygophylloideae.

IX.- RESUMEN

La familia Zygophyllaceae se encuentra actualmente dividida en 7 subfamilias, siendo la Zygophylloideae la que contiene el mayor número de géneros. En el presente trabajo se dan a conocer los números cromosómicos de doce especies en seis géneros de esta subfamilia, once de los cuales son recuentos originales.

Porlieria microphylla sería tetraploide con $2n = 52$ ($x = 13$). Plectrocarpa tetracantha es diploide con $n = 13$ ($x = 13$) mostrando una meiosis regular con formación de 13 bivalentes. Sericodes greggi posee $2n = 30$ ($x = 15$), este dato indicaría que este género no estaría muy relacionado con Larrea ($x = 13$) como lo sugiere la exomorfología de las flores y los frutos.

El género sudafricano Sisyndite posee un número básico $x = 10$ al igual que Pintoa chilensis. Si bien ambos géneros poseen el mismo número básico, Pintoa chilensis posee cromosomas de mayor tamaño.

En el género Bulnesia se han estudiado los cromosomas somáticos en siete especies, seis de ellas son diploides con $2n = 26$ ($x = 13$): B. arborea, B. carrapo, B. foliosa, B. retama, B. sarmientoi y B. schickendantzii. La especie restante (B. bonariensis) sería tetraploide con $2n = 52$. La polisomatía es bastante frecuente dentro de este género. Se estudió, además, el comportamiento de los cromosomas meióticos en cinco de las especies de Bulnesia (B. arborea, B. carrapo, B. foliosa, B. retama y B. schickendantzii) el cual fue regular en todas ellas, con la formación de 13 bivalentes. B. retama presenta cromosomas de tamaño considerablemente mayor que las otras especies, lo que se debería a un mayor contenido de DNA ($\bar{X} = 2.44 \pm 0.072$). Por medio de citoespectrofotometría se ha determinado que esta especie posee cuatro veces más DNA que la especie diploide B. foliosa ($\bar{X} = 0.63 \pm 0.029$) y casi el doble que la tetraploide B. bonariensis ($\bar{X} = 1.41 \pm 0.053$). El aumento significativo de DNA observado en B. retama jugaría un papel equivalente a la poli

ploidía dentro del proceso de especiación. El cariótipo de esta especie está formado por 4 m + 12 sm + 10 st. El resto de las especies parecen poseer cariótipos más simétricos que el de B. retama, aunque no ha sido posible determinarlos completamente dado el tamaño pequeño de sus cromosomas; B. schickendantzii poseería un cariótipo formado por 14 m + 12 sm.

La asimetría del cariótipo, el mayor tamaño de los cromosomas y el mayor contenido de DNA observado en B. retama parecerían concordar con una mayor especialización y adaptación a ambientes áridos, ya que esta especie es la más xerofila del género (Solbrig, 1972) y la xerofita arbustiva más extrema en la Argentina (Hunziker, com. verbal).

B. sarmientoi, en cambio, poseería el menor contenido de DNA del grupo. Según Crisci et al. (en preparación) esta especie arborea mostraría una extrema reducción en el número de folíolos, carpelos, tamaño de flores, etc. y sería la más aislada de todas las especies.


En consecuencia, en la evolución de las especies del género Bulnesia se habría producido tanto aumento como disminución en el contenido de DNA nuclear.

Sobre la base de los números básicos mencionados podría suponerse una mayor relación entre el género Larrea con los sudamericanos Porlieria, Plectrocarpa y Bulnesia que con Sericodes, Sisyndite y Pintoa.

Se realizó, además, estudios de compuestos fenólicos en hojas mediante cromatografía bidimensional en capa delgada en los géneros Bulnesia, Porlieria y Plectrocarpa. Mediante este estudio se pudieron diferenciar los tres géneros y las siete especies de Bulnesia a través de sus perfiles cromatográficos.

Técnicas de taxonomía numérica aplicadas a los resultados de cromatografía mostrarían la existencia de tres grupos fenéticos: uno constituido por B. arborea, B. carrapo, B. bonariensis, B. schickendantzii y B. foliosa, otro por B. sarmientoi y el último por B. retama.

Los géneros Porlieria y Plectrocarpa poseen algunos compuestos comunes entre sí y con Bulnesia. Estos compuestos, que también se encuentran en Larrea podrían ser indicadores importantes en el estudio de relaciones supragenéricas y su estudio ayudaría a definir y establecer una clasificación mas natural de la subfamilia Zygophylloideae.

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'C. S. S. S.', written in a cursive style.A second handwritten signature in black ink, appearing to be 'R. G. S.', written in a cursive style.

X.- BIBLIOGRAFIA

- Adams, R.P. 1972. Chemosystematic and numerical studies of natural populations of Juniperus pinchotii Sudw. Taxon 21:407-427.
- , ——. and B.L. Turner. 1970. Chemosystematic and numerical studies of natural populations of Juniperus ashei Buch. Taxon 19:728-751.
- Alston, R.E. 1965. Flavonoid chemistry of Baptisia: a current evaluation of chemical methods in the analysis of interspecific hybridization. Taxon 14(8):268-274.
- , ——. and B.L. Turner. 1962. New techniques in analysis of complex natural hybridization. Proceedings of the Nat. Acad. of Sci. 48(2):130-137.
- , ——. and ——. 1963. Natural hybridization among four species of Baptisia (Leguminosae). Amer. Journ. of Botany 50(2):159-173.
- Amin, A. 1972. In I OBP chromosome number reports XXXVIII. Taxon 21: 679-684.
- Astanova, S.B. 1970. A karyosystematic study of the species of Zygophyllum L. indigenous to Tajikistan (in Russian). Bot Zurn. (Moscow & Leningrad) 55(8):1089-1098.
- Atkin, N.B. and S. Ohno. 1967. DNA values of four primitive chordates. Chromosoma (Berl.) 23:10-13.
- Baquar, S.R. 1967. Intra-individual numerical chromosome instability in Eragrostis ciliaris L. Genet. Iber. 19:99-102.
- , ——. 1969. New basic chromosome number in Zygophyllum. Chromosome Inf. Service 10:22-23.
- , ——. 1970. Cytological studies in Eragrostis ciliaris L. from West Pakistan. Sci. Cult. 36:172-173.
- , ——., S. Akhtar and A. Husain. 1965. Meiotic chromosome numbers in some vascular plants of Indus delta. I. Bot. Notiser 118:289-298.
- Barbour, M.G. 1969. Patterns of genetic similarity between Larrea divaricata of North and South America. Amer. Midl. Naturalist 81:54-67.

- Beçak, W., M.L. Beçak, D. Lavallo and G. Schreiber. 1967. Further studies on polyploid amphibians (Ceratophyidae). II. DNA content and nuclear volume. *Chromosoma* (Berl.) 23:14-23.
- Bhattacharya, S.S., M.M. Khalifa and I.I. Chaudhri. 1971. In IOPB chromosome number reports XXII. *Taxon* 20:349-356.
- Bolkhovskikh, Z., V. Grif, T. Matvejeva and O. Zakharyeva. 1969. Chromosome numbers of flowering plants. Ed. by A. Fedorov. 926 pp. Leningrad.
- Borgen, L. 1969. Chromosome numbers of vascular plants from the Canary Islands, with special reference to the occurrence of polyploidy. *Nytt. Magasin for Botanik* 16:81-121.
- , —. 1970. Chromosome numbers of Macaronesian flowering plants. *Nytt. Mag. Bot.* 17:145-161.
- Brehm, B.G. and M. Ownbey. 1965. Variation in chromatographic patterns in the Tragopogon dubius-pratensis-porrifolius complex (Compositae). *Amer. J. Bot.* 52:811-818.
- Britten, R.J. and D.E. Kohne. 1968. Repeated sequences in DNA. *Science* 161:529-540.
- Cave, M.S. (editor) 1958-1964. Index to Plant Chromosome numbers. Vol I (1-4), Vol. 2 (5-9). Calif. Bot. Soc., Berkeley; Univ. of North Carolina Press, Chapel Hill, N.C.
- Christensen, B. 1966. Cytophotometric studies on the DNA content in diploid and polyploid Enchytraeidae (Oligochaeta). *Chromosoma* (Berl.) 18:305-315.
- Comas, C., and J.H. Hunziker. 1976. Electroforesis de las proteínas seminales de las especies de Bulnesia (Zygophyllaceae). 7^o Congr. An. Soc. Arg. Genet., Ushuaia, 12-17 Agosto 1976:40-41-1977. 3er. Congr. Latinoam. Genet. Resúm.: 21. Montevideo.
- Covas, G. 1949. Estudios cariológicos en antofitas. III. *Darwiniana* 9: 158-162.
- , —. y B. Schnack. 1946. Número de cromosomas en antofitas de la región de Cuyo (República Argentina). *Rev. Argent. Agron.* 13:153-166
- Cozzo, D. 1948. Anatomía del leño secundario de las especies argentinas de la tribu Zygophylleae. *Rev. del Inst. Nac. de Inv. de Cs. Nat.* 1(3):57.
- Darlington, C.D. 1964. Recent advances in cytology. Williams and Wilkins Co. Baltimore. 768 pp.

- Darlington, C.D. and A.P. Wylie. 1955. Chromosome Atlas of Flowering Plants. Allen and Unwin, Ltd., London.
- Dedio, W., P.J. Kaltsides and E.N. Larter. 1969. Numerical chemotaxonomy in the genus Secale. Can. Journ. of Bot. 47(7):1175-1180.
- Deitch, A.D., D. Wagner and R.M. Richart. 1968. Conditions influencing the intensity of the Feulgen reaction. The Journal of Histochem. and Cytochem. 16(5):371-379.
- Descole, H.R., C.A. O'Donnell y A. Lourteig. 1940. Revisión de las Zigofiláceas argentinas. Lilloa 5:257-352.
- Doby, G. 1965. Plant Biochemistry. Interscience Publ. London, New York, Sidney 768 pp.
- Dowrick, G.J. and A.S. El Bayoumi. 1969. Nucleic acid content and chromosome morphology in Chrysanthemum. Genet. Res. 13(3):241-250.
- Edwards, G.A., J.E. Endrizzi and R. Stein. 1974. Genome DNA content and chromosome organization in Gossypium. Chromosoma (Berl.) 47:309-326.
- Eid, S.E. 1970. In IOPB chromosome number reports XXVI. Taxon 19:264-269.
- El-Lakany, M.H. and J.R. Dugle. DNA content in relation to phylogeny of selected boreal forest plants. Evolution 26:427-434.
- Engler, A. 1896. Über die geographische Verbreitung der Zygothyllaceen im Verhältniss zu ihrer systematischen Gliederung. Abh. Königl. Acad. Wiss. Berlin 1896 (2):1-36. (Obra no vista)
- Feeny, P.P. 1969. Inhibitory effect of oak leaf tannins on the hydrolysis of protein by trypsin. Phytochem. 8:2119-2126.
- Fröst, S. and G. Holm. 1972. Thin-layer chromatographic studies of phenolic compounds in seventeen parental varieties of Barley. Hereditas 70:259-264.
- Gamundi, I.J., R.O. Cinto y J.I. Zylberfisz. 1975. Estudio de algunas especies del género Lamprospora (Discomycetes) usando técnicas de taxonomía numérica. Bol. Soc. Arg. Bot. 15:339-349.

- Gimenez, I. 1977. Cuantificación microespectrofotométrica del DNA en epitelio de lesiones orales. (Fac. de Odontología) Tesis
- Goldstein, J. and T. Swain. 1963. Changes in tannins in ripening fruits. *Phytochem.* 2:371-383.
- Grant, W.F. 1969. Decreased DNA content of birch (Betula) chromosomes at high ploidy as determined by cytophotometry. *Chromosoma* 26:326-336.
- Grant, V. 1971. *Plant Speciation*. Columbia Univ. Press. N.Y. and London, 435 pp.
- Harborne, J.B. 1972. Evolution and function of flavonoids in plants; in *Recent Advances in Phytochemistry*. V.C. Runeckles, J.E. Watkin Eds. Appleton-Century-Crufts. N.Y.
- Heiser, C.B., Jr., J. Soria and D.L. Burton. 1965. A numerical taxonomic study of Solanum species and hybrids. *Amer. Natur.* 99:471-488.
- Heywood, V.H. 1970. *Taxonomía vegetal*. Sección V, *Biol.*(14) 102 pp. Ed. Alhambra, S.A. Madrid.
- Hinegardner, R. 1976. Evolution of genome size. Chap. 11 in *Molecular Evolution*, F.J. Ayala (ed.) Sinauer Associates, Inc. Publishers..
- Hsiao, Ju-Ying. 1973. A numerical taxonomic study of the genus Platanus based on morphological and phenolic characters. *Am. Journ. of Bot.* 60(7):678.
- Hunziker, J.H. 1948. Sinopsis de las especies argentinas del género Ephedra. *Lilloa* XVII:147-174.
- , ——. 1966. Números cromosómicos y cariótipos de varias especies sudamericanas de Agropyron y Elymus (Gramineae). *Kurtziana* 3:151-156.
- , ——. 1975. On the geographical origin of Larrea divaricata (Zygophyllaceae). *Annals Miss. Bot. Garden* 62:497-500.
- , ——., R.A. Palacios, L. Poggio, C.A. Naranjo and T.W. Yang. 1977. Geographic distribution, morphology, hybridization, cytogenetics and evolution. Chap. II en Mabry, T.J., J.H. Hunziker and D.R. DiFeo (eds.) *US/IBP Synthesis Series 6 "Creosote Bush: Biology and Chemistry of Larrea in New World*

- Deserts". Dowden, Hutchison and Ross, Inc. Penn:284 pp.
- _____, ____, ____, _____, E.A. Soriano. 1969. Hibridación natural en especies sudamericanas de Larrea (Zygophyllaceae). Kurtziana 5:55-66.(Córdoba).
- _____, ____, ____, _____, A.G. Valesi y L. Poggio. 1972. Evolución en el género Larrea. Memorias de Symposia del I Congreso Latinoamericano y V Mexicano de Botánica. pag. 265-278. México.
- _____, ____, ____, _____, _____. 1973. Species disjunctions in Larrea:evidence from morphology, cytogenetics, phenolic compounds and seed albumins. Ann. of the Miss. Bot. Garden 59(2):224-233.
- _____, ____, ____, _____, _____. Hybridization in Larrea (Zygophyllaceae):a morphological, cytogenetics and chemosystematic study. Bol. Acad. Nac. Cs. Córdoba (en prensa).
- Hutchison, J. 1967. The genera of flowering plants. Vol. 2.xi + 659 pp. London.
- John, B. and G.M. Hewitt. 1966. Karyotype stability and DNA variability in the Acrididae. Chromosoma (Berl.) 20:155-172.
- Jones, K. 1970. Chromosome changes in plant evolution. Taxon 19(2): 172-179.
- Jones, R.N. and H. Rees. 1968. Nuclear DNA variation in Allium. Heredity 23:591-605.
- Kaltsides, P.J. and W. Dedio. 1970.a. A thin-layer chromatographic study of the phenolics of the genus Aegilops. I. Numerical chemotaxonomy of the diploid species. Can. Journ. of Bot. 48:1775-1780.
- _____, _____.^a and _____. 1970.b. A thin-layer chromatographic study of the phenolics of the genus Aegilops. II. Numerical chemotaxonomy of the polyploid species. Can. Journ. of Bot. 48:1781-1786.
- Keyl, H.G. 1965. A demonstrable local and geometric increase in the chromosomal DNA of Chironomus. Experientia (Barel) 21:191-193.

- Krapovickas, A., A. Fernandez y P. Seeligman. 1974. Recuperación de la fertilidad de un híbrido interespecífico estéril de Ara-chis (Leguminosae). Bonplandia Tomo III Nº 11:129-142.
- Leuchtenberg, C. 1958. Quantitative determination of DNA in cells by Feulgen microspectrophotometry; in "General cytochemical methods" Vol. I, ed. by J.F. Danielli. Academic Press Inc., New York.
- Levan, A., K. Fredga and A.A. Sandberg. 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. Hereditas 52(2):201-220.
- Mabry, T.J., D.R. DiFeo, Jr., M. Sakakibara, C.F. Bohnstedt, Jr., and D. Seigler. 1977. The natural products chemistry of Larrea. Chap. 5 en Mabry, T.J., J.H. Hunziker and D.R. DiFeo (eds.). US/IBP Synthesis Series 6 "Creosote Bush: Biology and chemistry of Larrea in New World Deserts. Dowden, Hutchinson and Ross, Inc. Penn.:284 pp.
- Martin, P.G. and R. Shanks. 1966. Does Vicia fava have multi-stranded chromosomes?. Nature 211 (5049):650.
- McLaren, I.A., S.M. Woods and J.R. Shea Jr. 1966. Politeny: a source of cryptic speciation among Copepods. Science 153:1641-1642.
- Mège, J. 1960. Troisième liste de nombres chromosomique d'espèces d'Afrique occidentale. Ann. Fac. Sci. Univ. Dakar 5:75-86.
- Miksene, J.P. and Y. Hotta. 1973. DNA base composition and repetitive DNA in several conifers. Chromosoma (Berl.) 41:29-36.
- Moore, R.J. (editor). 1973. Index to plant chromosome numbers for 1967-1971. Utrecht, Netherlands. 539 pp.
- Morishima, H. 1969. Phenetic similarity and phylogenetic relationships among strains of Oryza perennis estimated by methods of numerical taxonomy. Evolution 23:429-443.
- Naranjo, C.A. y A.B. Andrada. 1975. El cariótipo fundamental del género Hippeastrum L. (Amaryllidaceae). Darwiniana 19(2):566-582.
- Negodi, G. 1939. Caridlogía delle Rutaceae e delle Zygophyllaceae. Sci. Genet. 1:168-185.

- Núñez, O. 1963. An acetic-haematoxylin squash method for small chromosomes. *Caryologia* 21:115-119.
- Ornduff, R. (editor). 1967/69. Index to plant chromosome numbers for 1965-66-67. *Regnum vegetabile* 50-55-56.
- , —., W.A.M. Saleh and B.A. Bohm. 1973. The flavonoids and affinities of Blennosperma and Crocidium (Compositae). *Taxon* 22:407-412.
- Palacios, R.A. y J.H. Hunziker. 1972. Observaciones sobre la taxonomía del género Larrea (Zygophyllaceae). *Darwiniana* 17:473-476.
- Parups, E.V., J.R. Proctor, B. Meredith and J.M. Gillett. 1966. A numerotaxonomic study of some species of Trifolium section Lupinaster. *Can. J. Bot.* 44:1177-1182.
- Petriella, B. y J.V. Crisci, 1975. Estudios numéricos en Cycadales. I. Cycadales actuales: sistemática. *Bol. de la Soc. Arg. de Bot.* XVI(3):231-247.
- Porter, D.M. 1963. The taxonomy and distribution of the Zygophyllaceae of Baja California. *Mexico Contr. Gray Herb.* 192:99-135.
- , —. 1967. In documented chromosome numbers of plants. *Madroño* 19:134-136.
- , —. 1972. The genera of Zygophyllaceae in the Southeastern United States. *Jour. Arnold Arbor.* 53:531-552.
- , —. 1974. Disjunct distributions in the New World Zygophyllaceae. *Taxon* 23:339-346.
- Rahn, K. 1960. Danish scientific investigations in the Argentine under the auspices of the Fundación Williams Buenos Aires. Chromosome number in some South American angiosperms. *Bot. Tidssk.* 56:117-127.
- Rees, H. 1972. DNA in higher plants. In *Evolution of Genetic Systems*. H.H. Smith (ed.) Gordon and Breach (N. York, London, Paris).
- , —., F.M. Cameron, M.H. Hazarika and G.H. Jones. 1966. Nuclear variation between diploid angiosperms. *Nature* 211:828-830.

- , —. and G.H. Jones. 1967. Chromosome evolution in Lolium. Heredity 22:1-18.
- , —. and M.R. Walters. 1965. Nuclear DNA and the evolution of wheat. Heredity 20 (1):73.
- Reese, G. 1957. Über die polyploidiespektren in der nordsaharischen Wüstenflora. Flora 144 (4):598-634.
- Rhoades, D.F. 1977. The Antiherbivore chemistry of Larrea. Cap VI en Mabry, T.J., J.H. Hunziker and D.R. Difeo (eds.) US/IBP Synthesis Series 6 "Creosote Bush: Biology and chemistry of Larrea in New World Deserts". Dowden, Hutchison and Ross, Inc. Penn.:284 pp.
- Röhlf, F.J., J. Kispagha and D. Kirk. 1971. NT-SYS. Numerical Taxonomy System of Multivariate Statistical Programs. Tech. Rep. State University of New York at Stony Brook, New York (Obra no vista).
- Rothfels, K., E. Sexsmith, M. Heimbürger and M.O. Krause. 1966. Chromosome size and DNA content of species of Anemone L. and related genera (Ranunculaceae). Chromosoma 20:54-74.
- Runemark, H. 1968. Critical comments on the use of statistical methods in chemotaxonomy. Botaniska Notiser 121:29-43.
- Saez, F.A. 1960. El empleo de la hematoxilina acética o propiónica para el estudio de los cromosomas con la técnica del aplastamiento. Comun. Soc. Biol. Montevideo 11 de mayo 1960 (Mimeoog.).
- Schajowicz, A., I.B. Gimenez, C.J. Corti y R.L. Cabrini. 1976. Estudio microespectrofotométrico del ADN en condromas y condrosarcomas. Soc. Arg. de Ortopedia y Traumatología 3a. sesión ordinaria:147-154.
- Schnack, B. y G. Covas. 1947. Estudios cariológicos en Antofitas. Haumania 1:32-41.
- Smith, D.H. and D.A. Levin. 1963. A chromatographic study of reticulate evolution in the Appalachian Asplenium complex. Amer. J. Bot. 50:952-958.
- Sneath, P.H.A. and R.R. Sokal. Numerical Taxonomy. W.H. Freeman and Company, San Francisco:573 pp.

- Sokal, R.R. and P.H.A. Sneath. 1963. Principles of numerical taxonomy. J.H. Freeman and Co. San Francisco:359 pp.
- Solbrig, O.T. 1972. The floristic disjunctions between the "Monte" in Argentina and the "Sonoran Desert" in México and the United States. Ann. of the Miss. Bot. Garden 59(2):218-223
- , —. and Th. W.J. Gadella (ed.). 1970. Biosystematic literature. Utrecht, Netherlands. 566 pp.
- Southern, D.I. 1967. Species relationships in the genus Tulipa. Chromosoma (Berl.) 23:80-94.
- Stebbins, G.L. 1966. Chromosome variation and evolution. Science 152:1463-1469.
- , —. 1971. Chromosomal evolution in higher plants. Addison-Wesley publishing company.
- , —., B. Harvey, E.L. Cox, J.N. Rutger, G. Jelencovic and E. Yagil. 1963. Identification of the ancestry of an amphidiploid Viola with the aid of paper chromatography. Amer. Journ. Bot. 50:830-839.
- Stone, D.E., G.A. Adrouny and R.H. Flake. 1969. New World Juglandaceae. II. Hickory nut oils, phenetic similarities and evolutionary implications in the genus Carya. Amer. J. Bot. 56:928-935.
- Swanson, C.P. 1957. Cytology and Cytogenetics. Englewood Cliffs, N. J. Prentice-Hall Inc. 596 pp.
- Turner, B.L. 1973. Chemosystematic data: their use in the study of disjunctions. Ann. Missouri Bot. Gard. 59:152-164.
- Warburg, E.F. 1936. Taxonomy and relationships in the Geraniales in the light of their cytology. II. New Phytol. 37,189:210.
- Wells, P.V. and J.H. Hunziker. 1977. Origin of the creosote bush (Larrea) deserts of south western North America. Ann. Missouri Bot. Gard. 63:843-861.
- Yang, T.W. 1967. Chromosome number in populations of creosote bush (Larrea divaricata) in the Chihuahuan and Sonoran subdivisions of the North American desert. Jour. Arizona Acad. Sci. 4:183-184.

- , —— . 1968. A new chromosome race of Larrea divaricata in Arizona Western Reserve. Acad. Nat. Hist. Museum Spec. Publ. 2: 1-4.
- , —— . 1970. Major chromosome races of Larrea divaricata in North America. J. Arizona Acad. Sci 6(1):41-45.
- , ——., J.H. Hunziker, L. Poggio y C.A. Naranjo. 1977. Hybridization between South american Jarilla and North american diploid creosote bush (Larrea, Zygophyllaceae). Plant. Syst. and Evolut. (Viena) 126:331-346.
- , —— . and C.H. Lowe. 1968. Chromosome variation in ecotypes of Larrea divaricata in the North American desert. Madroño 19: 161-164.
- Zakharyeva, O.I. and S.B. Astanova. 1968. Chromosome numbers of some wild species of flowering plants of Middle Asia (In Russian). Reports Acad. Sci. Tadzhik S.S.R. 11:72-75.