

Tesis de Posgrado

Estructura poblacional y relaciones filogenéticas (Distancia y Parsimonia) en especie de Prosopis (Leguminosae) en base a marcadores moleculares

Bessegga, Cecilia

2001

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:

Bessegga, Cecilia. (2001). Estructura poblacional y relaciones filogenéticas (Distancia y Parsimonia) en especie de Prosopis (Leguminosae) en base a marcadores moleculares. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3422_Bessegga.pdf

Cita tipo Chicago:

Bessegga, Cecilia. "Estructura poblacional y relaciones filogenéticas (Distancia y Parsimonia) en especie de Prosopis (Leguminosae) en base a marcadores moleculares". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2001.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3422_Bessegga.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

**Universidad de Buenos Aires.
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.**

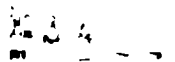
**Estructura Poblacional Y Relaciones Filogenéticas (Distancia Y
Parsimonia) En Especies De *Prosopis* (Leguminosae) En Base A
Marcadores Moleculares.**

Tesis presentada para optar al Título de Doctor en Ciencias Biológicas.

Por: Cecilia Bessega

Director: Beatriz Saidman

**Laboratorio de Genética. Departamento de Ciencias Biológicas.
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.
Universidad de Buenos Aires**



Quiero agradecer....

A la UBA y el CONICET por las becas otorgadas que me permitieron dedicarme completamente a esta tarea.

A la Universidad de Buenos Aires, al CONICET y a la ANPCyT por el apoyo financiero otorgado a la Dra. B. O. Saidman y Dr. J. C. Vilardi en forma de subsidios para llevar a cabo esta investigación.

Al Ing. Agr. R. Palacios quien determinó gran parte del material aquí estudiado.

A Dr. J. J. Doyle por las sondas de *Nicotiana tabacum*.

Al Dr. Pablo Villagra y al Ing. Mariano Cony por el material cedido.

A la Dra. Beatriz Saidman por abrirme la puerta de su laboratorio hace siete años atrás, por aconsejarme en este trabajo y mas allá de este trabajo. Por entenderme.

Al Dr. Juan C. Vilardi por su constante asesoramiento y por compartir tantas horas, casi como si fuera mi director.

A la Dra. María Isabel Remis por su buena predisposición y por "simplificar" la Genética de Poblaciones.

A la Dra. Viviana Confalonieri por ser profesora y amiga a la vez. Por estar siempre dispuesta y por dar lo mejor.

A la Dra. Cecilia Comas por estar ahí, cuando uno la necesita.

A la Dra. Lidia Poggio, por mostrarme por primera vez lo que era la Genética Evolutiva y por enseñarme todo lo que sé sobre *Zea*. Por querer que participe en su materia.

A los habitantes de los laboratorios 61, 62 y 65 que aunque nos separan algunas puertas, los siento cerca mío muchas mas veces de lo que ellos mismos se imaginan.

A la gente de la secretaría que cada vez que voy por algo me atienden de muy buena manera. A Gabriel que desde su lugar me prestó y ayudó cuando yo lo necesitaba.

A todas y cada una de las chicas que hacen que ir a la facu, sea lo mejor que uno puede hacer. A las chicas del GIBE por la buena onda y a Vero, Amalia, Sara, Gra, Andrea, Pao y Pau por poder esperar hasta que termine de escribir para reunirnos.

A Santi por entender que estos meses estuve muy ocupada y que ahora nos pondremos a trabajar con todo.

A Marina, una amiga que ya no veo todos los días, pero que me enseñó a trabajar en el laboratorio, me ayudo un montón y la quiero mucho.

A Pablo Colombo, por las charlas mas allá de la ciencia.

A Grise, mi amiga de la facu, que durante todos estos años encontré por los pasillos del cuarto piso.

A Juanjo, por las fotos.

A toda mi familia, que de todas las formas posibles, me ayudaron a que este trabajo hoy se pueda presentar.

Resumen -----	1
Abstract -----	3
 Capítulo 1 - Introducción	
I. Estudios Genético - Evolutivos En El Género <i>Prosopis</i> -----	6
II. Utilización De Marcadores Moleculares-----	12
III. Material Biológico -----	15
 Capítulo 2 - Variabilidad Genética y Estructura de Poblaciones	
I. Introducción -----	22
II. Conocimiento Actual En El Género <i>Prosopis</i> -----	28
Objetivos -----	31
III. Variabilidad y Diferenciación Genética en Poblaciones Norteamericanas. Comparación con especies Sudamericanas previamente estudiadas.-----	32
IIIa. Resultados -----	32
IIIb. Discusión -----	39
IV. Variabilidad Y Diferenciación Genética En Especies Sudamericanas De Las Secciones Monilicarpa, Strombocarpa Y Algarobia. -----	42
IVa. Resultados -----	42
IVb. Discusión-----	53
V. Sistema De Apareamiento -----	54
Va. Resultados -----	55
Vb. Discusión-----	59
 Capítulo 3 - Relaciones Filogenéticas: Métodos De Distancia Y Parsimonia	
I. Introducción-----	62
Ia. Relaciones Filogenéticas-----	62
Ib. <i>Prosopis</i> -----	73
Objetivos-----	75
II. Resultados y Discusión-----	75
IIa. Isoenzimas -----	75
IIb. Polimorfismos Para El Largo De Los Fragmentos De Restricción--	81
IIc. Secuenciación De Intergén <i>TrnT- TrnD</i> (cpDNA)-----	86
IIId. Secuenciación De Los Espaciadores Internos No Transcritos Del ADN Ribosómico (ITS1-ITS2)-----	91
IIe. Congruencia Entre Arboles-----	97
 Capítulo 4 - Discusión General	
Discusión general -----	106
 Apéndices-----	 124
 Bibliografía -----	 156

Prosopis es un género que presenta gran importancia desde el punto de vista económico, ecológico y evolutivo. Habita en las principales zonas áridas y semiáridas del mundo y en base a su morfología ha sido dividido en cinco secciones denominadas *Prosopis*, *Anonychium*, *Monilicarpa*, *Strombocarpa* y *Algarobia*. Esta última incluye 30 especies de las cuales la mayor parte habitan en América, con el principal centro de diversidad en Argentina. Algunas especies de esta sección hibridan frecuentemente en la naturaleza dando lugar a individuos con fenotipos intermedios, difíciles en algunos casos de determinar. En este trabajo se analizaron marcadores bioquímicos y moleculares en poblaciones de *P. glandulosa*, *P. velutina*, *P. alba*, *P. nigra*, *P. vinalillo*, *P. alpataco*, *P. caldenia*, *P. ruscifolia*, *P. flexuosa*, *P. chilensis*, *P. affinis*, *P. kuntzei* de *Algarobia*, *P. reptans* de *Strombocarpa* y *P. argentina* de *Monilicarpa*.

Se estudiaron poblaciones naturales mediante las técnicas de electroforesis de isoenzimas y RAPD con el objeto de identificar loci diagnóstico, estimar la variabilidad y analizar la estructura poblacional. Se compararon poblaciones naturales de diferente subcontinentes pertenecientes a *Algarobia* junto con *P. reptans* (*Strombocarpa*) y *P. argentina* (*Monilicarpa*). Los resultados señalaron que *P. velutina* y *P. kuntzei* son las únicas que presentaron loci isoenzimáticos diagnósticos. Las especies Norteamericanas *P. glandulosa* y *P. velutina* no presentaron bandas RAPD diagnósticas con los "primers" ensayados. Los niveles de variabilidad genética estimados en las poblaciones Norteamericanas son semejantes a los de las especies Sudamericanas de la misma sección; y las poblaciones presentan las mismas variantes isoenzimáticas. Los niveles de variabilidad genética de *P. reptans* (*Strombocarpa*) y *P. argentina* (*Monilicarpa*) no difieren entre sí, aunque son significativamente menores que las de las especies de *Algarobia*. La diferenciación genética entre las poblaciones de la sección *Monilicarpa* es menor a la presentada por las especies de *Algarobia* estudiadas. Como consecuencia, el flujo génico estimado entre las poblaciones de *P. argentina* es mayor que el de las especies de *Algarobia*.

Un estudio de individuos agrupados por familias fue realizado mediante electroforesis de isoenzimas para inferir el sistema de apareamiento en siete especies de la sección *Algarobia*. Los resultados mostraron que las especies presentan en la mayoría de los casos fecundación cruzada pero que hasta un 28% de autofecundación puede ocurrir (t_m varió entre 0.72 y 1). El valor promedio en todas las especies aquí estudiadas es de 15%. Las tasas de fecundación cruzada variaron entre los árboles dentro de las poblaciones y la

mayoría de los individuos analizados (semillas) dentro de cada familia eran hermanos completos.

Se realizó un estudio de RFLP utilizando como sonda 27.7 kb de cpDNA heterólogo de *Nicotiana tabacum* en 11 especies del género. Los resultados no mostraron variación intraespecífica en ningún caso y sólo permitieron diferenciar a *P. reptans* y a *P. kuntzei* de las restantes especies de *Algarobia* estudiadas (*P. alba*, *P. nigra*, *P. vinalillo*, *P. alpataco*, *P. caldenia*, *P. ruscifolia*, *P. flexuosa*, *P. glandulosa*, *P. affinis*).

Por último, las relaciones filogenéticas entre las especies fueron reconstruidas mediante métodos de distancia y parsimonia a partir de las frecuencias alélicas isoenzimáticas, de las secuencias correspondientes al intergén *TrnD-TrnT* (cpDNA) y de las secuencias de los espaciadores internos transcritos de ADN ribosómico (ITS-1 e ITS-2). Los fenogramas obtenidos a partir de los datos de enzimas señalaron que *P. reptans* (Strombocarpa), *P. argentina* (Monilicarpa) y *P. kuntzei* son las especies más diferenciadas. A pesar de que los cladogramas de cpDNA y de ADNr resultaron incongruentes, presentan consistencia. El orden relativo de divergencia señalado en ambos cladogramas concuerda con el nivel de diferenciación genética en los fenogramas. Además, ni los fenogramas ni los cladogramas están de acuerdo con la clasificación morfológica en series propuesta para este grupo.

Palabras Claves: *Prosopis*, Isoenzimas, RAPD, RFLP, *TrnT-TrnD*, ITS, estructura poblacional, sistema de apareamiento, relaciones evolutivas

Prosopis is a very important genus from the economic, ecological and evolutionary point of view. It occupies the main arid and semi-arid areas of the world and, based on the morphology, its species have been divided into five sections denominated *Prosopis*, *Anonychium*, *Monilicarpa*, *Strombocarpa* and *Algarobia*. The latter includes 30 species, most of which are American, with the main diversity center in Argentina. Some species of this section frequently hybridise in the nature producing individuals with intermediate phenotypes that sometimes are difficult to determine. In this work biochemical and molecular markers were analyzed in populations of *P. glandulosa*, *P. velutina*, *P. alba*, *P. nigra*, *P. vinalillo*, *P. alpataco*, *P. caldenia*, *P. ruscifolia*, *P. flexuosa*, *P. chilensis*, *P. affinis*, *P. kuntzei* of *Algarobia*, *P. reptans* of *Strombocarpa* and *P. argentina* of *Monilicarpa*.

Natural populations were studied by means of isoenzyme electrophoresis and RAPD techniques, in order to identify diagnostic loci, to estimate the variability and to analyze the structure of populations. Populations of species from different subcontinents belonging to *Algarobia* were compared, together with *P. reptans* (*Strombocarpa*) and *P. argentina* (*Monilicarpa*). The results indicated that *P. velutina* and *P. kuntzei* are the only ones which showed isoenzymatic diagnostic loci. The North American species, *P. glandulosa* and *P. velutina*, did not present diagnostic RAPD bands with the primers here used. Genetic variability estimates in populations of North American species of *Algarobia* are similar to those of the South American ones of the same section, and they share most isoenzymatic alleles. *P. reptans* (*Strombocarpa*) and *P. argentina* (*Monilicarpa*) do not differ from each other in genetic variability, but their variability is significantly lower than that of species of *Algarobia*. The genetic differentiation among populations in the section *Monilicarpa* is lower than in the species studied of *Algarobia*. Thus, the estimated gene flow among populations of *P. argentina* is higher than those of *Algarobia* species.

A study of individuals grouped by families was carried out by isoenzyme electrophoresis to estimate parameters of the mating system in seven species of the section *Algarobia*. The results showed that species are mostly outcrosser but up to 28% of selfing can occur (t_m varied between 0.72 and 1). The average value in all the species here studied is of 15%. Outcrossing rates vary among the trees within the populations and most of the analyzed individuals (seeds) within each family are full sibs.

A study of RFLP using a heterologous cpDNA probe of *Nicotiana tabacum* (27.7 kb) was carried out in 11 species of the genus. The results did not show intraspecific variation in any of the species studied. Only *P. reptans* and *P. kuntzei* could be distinguished from the remaining studies species of Algarobia (*P. alba*, *P. nigra*, *P. vinalillo*, *P. alpataco*, *P. caldenia*, *P. ruscifolia*, *P. flexuosa*, *P. glandulosa*, *P. affinis*).

Finally, the phylogenetic relationships among species were reconstructed through distance and parsimony methods from isoenzymatic allelic frequencies, the sequences corresponding to the intergenic region *TrnT-TrnD* (cpDNA) and the sequences of internal transcribed spacers from ribosomic DNA (ITS-1 and ITS-2). The phenograms obtained from the enzyme data indicated that *P. reptans* (Strombocarpa), *P. argentina* (Monilicarpa) and *P. kuntzei* are the most differentiated species. Although the cpDNA and rDNA cladograms were incongruent, they present some consistence. The relative divergences of basal nodes in both cladograms are consistent with the level of genetic differentiation in the phenograms. Furthermore, none of the trees agrees with the morphological classification of proposed series for this group.

Key Words: *Prosopis*, Isoenzymes, RAPD, RFLP, *TrnT-TrnD*, ITS, Population structure, Mating system, Evolutionary relationships

Capítulo 1

Introducción

I. Estudios Genético - Evolutivos En El Género *Prosopis*

II. Utilización De Marcadores Moleculares

III. Material Biológico

I. Estudios Genético - Evolutivos En El Género *Prosopis*

El género *Prosopis* es uno de los más primitivos dentro de la subfamilia Mimosoidae de la familia Leguminosae. Sus especies son capaces de adaptarse a las condiciones extremas de sequía, altas temperaturas y salinidad de las zonas áridas y semiáridas que habitan normalmente. Su amplia distribución geográfica abarca el sureste de Asia, África tropical y América. En este último continente se distribuye desde el Sudoeste de Estados Unidos hasta la Patagonia Argentina. En América hay 44 especies, de ellas 28 se encuentran en Argentina y 13 son endémicas. En Norteamérica (USA) se han descripto 7 especies aunque no se han encontrado endemismos (Burkart 1976).

Actualmente, los árboles y arbustos de *Prosopis* tienen una importancia fundamental en la economía de zonas áridas y semiáridas por los múltiples usos a los que pueden destinarse. Las vainas se han utilizado como forraje desde épocas prehistóricas en América, Asia y África (Roig 1993, Galera *et al* 1992). Desde entonces en diferentes lugares del mundo se las emplea para alimentación debido a su alto valor alimenticio semejante a la cebada y al maíz. En nuestro país, en Chile y en Perú se las emplea en pastoreo directo y diferido. La recolección y secado de frutos resulta útil para alimentar ganado vacuno, ovino y caballar durante el invierno (Galera *et al* 1992). La utilización de los frutos como fuente de alimentación humana persiste en zonas rurales donde se obtiene harina para producir pan de algarroba (patay) y se elaboran algunas bebidas como la chicha, añapa y arrope. Además las vainas fermentadas (okpiye) sirven para condimentar la dieta tradicional y para sustituir la carne que resulta muy costosa para algunas familias de Nigeria (Achi 1992).

Otra aplicación muy importante desde el punto de vista económico es la madera de algunas de sus especies que se emplea como combustible de alta calidad, como leña o carbón vegetal. La madera resulta muy útil en la construcción de postes, muebles y aberturas ya que se muestra muy durable, sólida y pesada. Es altamente resistente a la torsión y a la contracción y en los últimos años esta madera se ha puesto de moda por sus características y su bajo costo (Tortorelli 1956, Felker 1982, Roig 1993). De las raíces y de la corteza de algunas especies es posible también la obtención de taninos útiles para curtientes y para la tinción de fibras (Karlin y Díaz 1988A, Roig 1993).

Desde el punto de vista ecológico, algunas especies de este género resultan muy útiles en el control de la erosión y degradación de suelos ya que son especies fijadoras de dunas (Burkart 1952). Además poseen la habilidad para la fijación biológica de nitrógeno, que produce un mejoramiento en la fertilidad del suelo. Además, ciertas especies resultan muy útiles en sistema agroforestales y agropastoriles al suministrar sombra para la protección de animales y cultivos (Karlin y Díaz 1988B).

En nuestro país es posible distinguir cuatro épocas históricas en el empleo de los algarrobos (Roig 1993). La primera de ellas corresponde a la época primitiva, la segunda, se inició con la introducción del ganado y la tercera, coincide con el desarrollo ferroviario. La época actual, la cuarta, está orientada a la conservación del recurso a través de planes de mejoramiento y a la búsqueda de un uso sostenido del mismo.

La gran importancia económica que presentan las especies ha dado lugar a la explotación indiscriminada de los montes naturales de *Prosopis*. El

desarrollo de planes que permitan mejorar características beneficiosas y conservar este recurso son cada vez más necesarios. Dentro de este marco, las especies arbóreas de mayor interés comercial están siendo utilizadas actualmente en planes de reforestación de zonas áridas. En particular, en el monte argentino se llevan a cabo programas de conservación y mejoramiento de *P. flexuosa* (Cony 1993, Catalán *et al* 1994) y en Brasil existen plantaciones comerciales de *P. juliflora* (Fernández Lima 1990).

Desde el punto de vista teórico *Prosopis* también ha resultado sumamente interesante; recién en 1976 se realizó la primera monografía integral de este género que ha sido tomada en cuenta por sistemáticos, genetistas y ecólogos de todo el mundo. Muchos grupos de investigación trabajaron y trabajan a través de distintos enfoques en la resolución de interrogantes que surgen del comportamiento en la naturaleza de sus especies.

En su monografía Burkart (1976) dividió al genero en cinco secciones: *Prosopis*, *Anonychium*, *Monilicarpa*, *Strombocarpa* y *Algarobia* (Apéndice 1 pag. 125). Mientras que las primeras dos sólo están representadas en Asia y África, las últimas tres se desarrollan en América.

En *Algarobia*, una de las cinco secciones que integran este género, la determinación morfológica es problemática debido al comportamiento de las mismas en la naturaleza. Existen en la literatura numerosos ejemplos de hibridación interespecífica (Hunziker *et al* 1986) involucrando diferentes especies tales como *P. alba*, *P. nigra*, *P. flexuosa*, *P. ruscifolia*, *P. caldenia*, *P. affinis*, *P. chilensis*, *P. hassleri*, *P. alpataco*, etc., aunque también hay otras especies en las cuales hasta el momento no han sido reportados casos de

hibridación tales como *P. kuntzei*, *P. sericantha*, *P. denudans*, etc. La alta ocurrencia de hibridación e introgresión produce la aparición de fenotipos nuevos que en algunos casos resultan difíciles de determinar morfológicamente.

Estudios isoenzimáticos previos en algunas especies de la sección *Algarobia* (Saidman 1985, 1986, 1993, Verga 1995, Julio 2000, Ferreyra 2001, Saidman y Vilardi 1987, 1993, Hunziker *et al* 1986) señalaron una similitud genética alta, tal como la que se esperaría para semi o subespecies. La similitud alozímica podría indicar que los taxones se han diferenciado poco genéticamente, lo cual coincidiría con una aparente debilidad de las barreras de aislamiento reproductivo (Saidman 1990). Sin embargo, desde el punto de vista morfológico, las especies mostraron una clara diferenciación. En la sección *Strombocarpa* por el contrario, los problemas de delimitación de las especies son menos frecuentes. La hibridación no es un hecho común entre las especies de esta sección y las mismas están bien diferenciadas tanto morfológica como bioquímicamente.

La hibridación que ocurre en la naturaleza debe ser distinguida del proceso de especiación por hibridación. La hibridación natural ha sido definida como el fenómeno de cruzamiento al azar espontáneo entre razas disyuntas, semiespecies o especies que están separadas por aislamiento ecológico parcial o reproductivo, o ambos (Grant 1989 pag. 213). En la naturaleza existen muchos ejemplos de híbridos interespecíficos, presumiblemente de la generación F_1 . Los mismos pueden ser fértiles, semiestériles o altamente estériles y excepto en el último caso, pueden producir una progenie tardía. La generación F_1 parcialmente fértil puede reproducirse con plantas híbridas

hermanas, o retrocruzarse con alguna de las especies parentales. La progenie surgida puede cruzarse una vez mas entre sí y con las plantas originales dando como resultado un enjambre híbrido. Los enjambres híbridos están formados por una mezcla de especies, híbridos y retrocruzas.

La especiación por hibridación se refiere al origen de una nueva especie directamente a partir de un híbrido natural. El mismo proceso que formó al híbrido natural ocasionará la desintegración por segregación de su combinación génica, por consiguiente una parte fundamental en el proceso de especiación es la estabilización del comportamiento reproductivo de los híbridos que puede darse por diferentes mecanismos tales como la propagación vegetativa, la agamospermia, la heterocigosidad de translocación permanente, la poliploidía impar permanente, la anfiploidía, la especiación por recombinación y por la segregación de un nuevo tipo aislado por barreras externas (Grant 1989 pag. 262).

En *Prosopis*, algunas especies podrían haberse formado por especiación híbrida (Ferreyra 2001, Saidman *et al* 1998). Palacios *et al* (1991) han demostrado el posible origen híbrido para la especie *P. burkartii* (Sección *Strombocarpa*) a partir de *P. tamarugo* y *P. strombulífera*. Tanto los estudios morfológicos como los de cromatografía de flavonoides y los de electroforesis de proteínas seminales han permitido corroborar esta hipótesis. Recientemente Burghardt *et al* (2001) estudiaron mediante electroforesis de proteínas seminales individuos de *P. abbreviata*, un arbusto espinoso morfológicamente intermedio entre *P. torquata* y *P. strombulífera*. Esta especie presenta un perfil proteico que muestra adición casi completa de las bandas halladas en los otros dos taxa y los autores proponen que constituye

una fuerte evidencia para su origen híbrido que se corresponde con los datos morfológicos previos y los estudios de fertilidad de polen.

En la sección Algarobia, se ha sugerido un origen híbrido para *P. vinalillo* a partir de *P. alba* var. *panta* y *P. ruscifolia* (Burkart 1976). A través del estudio isoenzimático y de RAPD, Ferreyra (2001) no encontró marcadores característicos de *P. alba*. Allí no se descartó a la hibridación homógama como mecanismo de especiación híbrida, en donde se espera que los derivados híbridos tengan un ciclo meiótico normal y las especies así surgidas sean homoploides respecto a las especies progenitoras originales (Grant 1989 pag. 292). Sin embargo, se propuso que los marcadores podrían haberse perdido por recombinación y segregación. Otros autores (Palacios com. pers.) proponen que los individuos así determinados no serían una especie de origen híbrido sino un híbrido natural.

En base a las estructuras vegetativas Burkart (1937A, 1976) ha definido la Sección Monilicarpa, que está representada por una única especie, *P. argentina* cuyo origen y afinidades son dudosos. Los trabajos fisiológicos y de maderas involucrando esta especie la muestran altamente tolerante a la temperatura y al stress hídrico en concordancia con su hábito de ocupar suelos arenosos móviles y semifijos (Villagra 1995, 1997, Villagra y Roig Juñet 1997). El nivel de variabilidad genética y diferenciación isoenzimática que existe entre las poblaciones de esta especie no ha sido descrito así como tampoco la ocurrencia de híbridos entre secciones que la involucraran.

Este género permite acercarse al estudio de un problema teórico muy importante como es el mecanismo de especiación y a través del estudio de los

datos genéticos es posible discutir la delimitación existente entre las especies. Así, varios autores (Montoya *et al* 1994, Burghardt 1995A, 1995B, Ferreyra 2001) han sugerido que algunas especies de *Algarobia*, que hibridan en la naturaleza frecuentemente, no se ajustarían al concepto biológico de especie sino al concepto cohesivo propuesto por Templeton (1989). Según éste, la principal fuerza que conduce al proceso de especiación puede ser la presión selectiva diferencial que permite la adaptación a diferentes nichos. Este concepto considera que las especies mantendrían su identidad por mecanismos ecológicos o demográficos, independientemente de la ocurrencia de flujo génico.

El mayor conocimiento de las especies de este género en cuanto a su caracterización, el nivel de variabilidad, la estructura genética de sus poblaciones y el análisis de las relaciones filogenéticas podrán aportar información para el mejoramiento, conservación y evolución de este grupo.

II. Utilización De Marcadores Moleculares

Desde hace alrededor de 30 años se ha desarrollado el uso de diferentes técnicas útiles para revelar diferentes marcadores bioquímicos de las plantas tales como los compuestos fenólicos, las proteínas seminales y las isoenzimas. Los últimos avances en el análisis de ADN hicieron posible desarrollar nuevas metodologías que permiten el estudio de marcadores moleculares tanto a nivel nuclear como en genomas de organelas (cloroplastos y mitocondrias). Los marcadores moleculares permiten analizar y caracterizar la variación molecular y aplicar los datos genéticos para la construcción de filogenias entre diferentes taxa. El marcador molecular a aplicar depende

directamente del nivel taxonómico en que se encuentre el problema que se quiere abordar pudiendo resolverse problemas de filiación entre individuos, diferenciación de poblaciones, hasta filogenias en taxones superiores (Avice 1994).

La electroforesis de isoenzimas se ha utilizado desde los años 70 para acercarse a problemas taxonómicos, genéticos y evolutivos ya que permite estudiar la variabilidad y diferenciación genética que presentan los grupos naturales. Dado que son marcadores codominantes, se han obtenido buenas estimas de variabilidad tanto a nivel poblacional como a nivel de especie. Mediante el análisis de variantes enzimáticas se estudia indirectamente los polimorfismos en regiones codificantes tanto nucleares como de organelas y su nivel de variación es restringido ya que está dado por el equilibrio entre la tasa de sustitución y la pérdida de funcionalidad. En general se las considera neutras pero existen trabajos recientes donde se describen fuerzas selectivas actuando sobre ellas (Nevo 2001, Berry y Kreitman 1993, Eanes *et al* 1993, 1996, Hudson *et al* 1994, Balakirev *et al* 1999).

Algunos años mas tarde se desarrolló la técnica de RAPD (Amplificación al Azar de Fragmentos Polimórficos - Williams *et al* 1990), mediante esta metodología se estudian directamente polimorfismos de ADN en regiones aleatorias del genoma siendo posible analizar los niveles de variabilidad y diferenciación genética. A diferencia de las isoenzimas, éstos son marcadores dominantes, es decir que los individuos heterocigotas no pueden ser reconocidos, de modo que los niveles de variabilidad podrían estar subestimados. A pesar de ello, suelen analizarse pues resultan mejores indicadores de la acción de fuerzas microevolutivas tales como la selección al

hacer un muestreo aleatorio de regiones codificantes y no codificantes del genoma.

Para analizar polimorfismos de ADN se utiliza también la técnica de RFLP (Polimorfismos para el Largo de los Fragmentos de Restricción); estos marcadores suelen ser codominantes y a diferencia de los RAPD, se estudian regiones específicas del genoma. El estudio de ADN de cloroplasto es un caso particular que posee una clara ventaja frente a otras regiones y ha sido ampliamente utilizado. Es una organela de herencia uniparental en la mayoría de las plantas que suele heredarse de forma materna y por lo general no ocurre recombinación entre sus genes. Las regiones codificantes suelen revelar bajos niveles de variación intraespecífica y pueden resultar una alternativa para estudiar otros tipos de variaciones como ser duplicaciones o rearrreglos. Por otro lado, las regiones no codificantes de esta organela presentan tasas de mutación relativamente mayores y resultan útiles para buscar buenos marcadores genéticos y analizar la variabilidad genética en las poblaciones naturales.

Una metodología que se ha desarrollado en los últimos 10 años es la secuenciación directa del ADN. Son muchas las regiones que pueden analizarse mediante esta metodología y es difícil la elección de la porción del genoma que ayude a resolver la problemática de cada grupo. Para reconstruir la historia de las especies se buscan regiones lo suficientemente variables que revelen diferencias entre las mismas pero que no presenten variación intraespecífica. Además, en términos generales, la información brindada por un grupo genómico (organelas) se enriquece cuando es contrastada con datos de otra fuente de información como ser los marcadores nucleares. Así, la secuenciación de una

región de cloroplasto (por ejemplo: un intergén) y de una región nuclear (por ejemplo: los espaciadores transcritos de los genes ribosómicos) pueden permitir analizar y contrastar las relaciones entre diferentes especies taxonómicas.

III. Material Biológico

En este trabajo se analizaron especies pertenecientes a las secciones *Algarobia*, *Monilicarpa* y *Strombocarpa* mediante las técnicas de electroforesis de isoenzimas, amplificación al azar de fragmentos polimórficos, polimorfismos para el largo de los fragmentos de restricción, y secuenciación directa de ADN.

En la Tabla 1.1 (pag. 17) se presentan las poblaciones naturales estudiadas con cada metodología: Isoenzimas, RAPD, RFLP, Secuenciación directa de intergén de cpDNA (*TrnT-TrnD*) y de los espaciadores transcritos ribosómicos (ITS-1 e ITS-2).

En la Tabla 1.2 (pag. 18) se presentan tanto los investigadores que realizaron las colecciones y la determinación del material así como la ubicación (provincia, latitud y longitud) de los sitios de muestreo de cada población estudiada.

Las poblaciones han sido muestreadas siguiendo los criterios descriptos por Vilardi *et al* (1988). Se coleccionaron aproximadamente 50 vainas correspondientes a 10 árboles madre por población tomando en cuenta una separación de alrededor de 50 m. con el fin de muestrear la mayor diversidad

presente en cada población. Todas las semillas de cada árbol madre fueron puestas en una única bolsa a fin de evitar el estudio de individuos más emparentados.

Cada metodología empleada requirió un número distinto de semillas analizadas que se describe en cada caso. Las poblaciones correspondientes a las especies Norteamericanas fueron cedidas gentilmente por el Dr. DeLoack (Grassland Research Institute - USDA) y coleccionadas con el mismo criterio, aunque solamente cinco árboles madre fueron muestreados. Las dos poblaciones de *P. argentina* y una de las poblaciones de *P. flexuosa* estudiadas fueron donadas gentilmente por el Dr. Pablo Villagra y el Ing. M. Cony respectivamente (IADIZA). En las Figuras 1.1 y 1.2 se indican los sitios de muestreo de las poblaciones Sud y Norteamericanas respectivamente.

Tabla 1.1. Poblaciones naturales analizadas.

Técnica	Especie	Población
ISOENZIMAS	<i>P. argentina</i>	Tinogasta - Tucunuco
	<i>P. reptans</i>	Herrera
	<i>P. kuntzei</i>	Tacana
	<i>P. flexuosa</i> * #	Quilmes - La Amarga
	<i>P. nigra</i> #	Huilla Catina - La Merced
	<i>P. ruscifolia</i> #	Herrera - Rivadavia- Pinto - Sarmiento
	<i>P. vinalillo</i> #	7 de Abril
	<i>P. chilensis</i> //	Talampaya - Belén - La Higuerita - Patquía
	<i>P. velutina</i> *	Santa Rita
	<i>P. glandulosa</i> *	Weslaco - La Copita - Frio Co - Bell Co
RAPD	<i>P. alba</i> #	Chicoana - Trancas- La Merced- Sumalao - Burruyacú -Curtiembres - Icaño
	<i>P. velutina</i>	Santa Rita
RFLP	<i>P. glandulosa</i>	Weslaco - La Copita - Frio Co - Bell Co
	<i>P. reptans</i>	Herrera
	<i>P. kuntzei</i>	Herrera
	<i>P. alba</i>	Casares
	<i>P. flexuosa</i>	Pipanaco
	<i>P. nigra</i>	Huilla Catina
	<i>P. ruscifolia</i>	Herrera
	<i>P. vinalillo</i>	7 de Abril
	<i>P. alpataco</i>	R152Km95
	<i>P. caldenia</i>	R152Km95
	<i>P. glandulosa</i>	BellCo
TrnT - TrnD e ITS-1 - ITS-2	<i>A. aroma</i>	Huilla Catina
	<i>P. argentina</i>	Tinogasta
	<i>P. reptans</i>	Herrera
	<i>P. kuntzei</i>	Herrera
	<i>P. alba</i>	Casares
	<i>P. flexuosa</i>	Pipanaco
	<i>P. nigra</i>	Huilla Catina
	<i>P. ruscifolia</i>	Herrera
	<i>P. vinalillo</i>	7 de Abril
	<i>P. alpataco</i>	R152Km95
	<i>P. caldenia</i>	R152Km95
	<i>P. glandulosa</i>	BellCo
	<i>P. affinis</i>	Hasenkamp

*tomado de Bessega 1997 // tomado de Julio 2000 # tomado de Ferreyra 2001

Tabla 1.2 Descripción de sitios de colección (provincia, latitud y longitud) e investigadores que realizaron las colecciones y determinación del material.

Especie	Población	Provincia	Latitud-Longitud	Colector	Determinado por
<i>P. argentina</i>	Tucunuco	San Juan	30°35'S-68°36'W	IADIZA	Ing. F. Roig (IADIZA)
	Tinogasta	Catamarca	28°38'S-68°19'W	IADIZA	Ing. F. Roig (IADIZA)
<i>P. reptans</i>	Herrera	S. Estero	28°28'S-63°04'W	Saidman-Vilardi	Ing. R.A. Palacios (UBA)
<i>P. kuntzei</i>	Tacana	Salta	28°39'S-65°36'W	Saidman-Vilardi	Ing. R.A. Palacios (UBA)
	Herrera	S. Estero	28°28'S-63°04'W	Saidman-Vilardi	Ing. R.A. Palacios (UBA)
<i>P. alba</i>	Chicoana	Salta	25°06'S-65°30'W	Saidman-Vilardi	Ing. R.A. Palacios (UBA)
	Trancas	Tucumán	26°13'S-65°16'W	Saidman-Vilardi	Ing. R.A. Palacios (UBA)
	La Merced	Salta	24°58'S-65°29'W	Saidman-Vilardi	Ing. R.A. Palacios (UBA)
	Sumalao	Salta	25°02'S-65°30'W	Saidman-Vilardi	Ing. R.A. Palacios (UBA)
	Burruyacú	Tucumán	26°30'S-64°43'W	Saidman-Vilardi	Ing. R.A. Palacios (UBA)
	Curtiembres	Salta	25°41'S-65°42'W	Saidman-Vilardi	Ing. R.A. Palacios (UBA)
	Icaño	S. Estero	28°41'S-62°53'W	Saidman-Vilardi	Ing. R.A. Palacios (UBA)
	Casares		28°56'S-62°48'W	Saidman-Vilardi	Ing. R.A. Palacios (UBA)
<i>P. flexuosa</i>	Quilmes	Tucumán	26°22'S-65°58'W	Saidman-Vilardi	Ing. R.A. Palacios (UBA)
	La Amarga	La Pampa	38°10'S-66°06'W	Saidman-Vilardi	Ing. R.A. Palacios (UBA)
	Pipanaco	Catamarca	27°48'S-66°20'W	IADIZA	Ing. R.A. Palacios (UBA)
<i>P. nigra</i>	Huilla Catina	S. Estero	27°32'S-64°06'W	Saidman-Vilardi	Ing. R.A. Palacios (UBA)
	La Merced	Salta	24°58'S-65°29'W	Saidman-Vilardi	Ing. R.A. Palacios (UBA)
<i>P. ruscifolia</i>	Herrera	S. Estero	28°28'S-63°04'W	Saidman-Vilardi	Ing. R.A. Palacios (UBA)
	Rivadavia	Salta	24°11'S-62°53'W	Saidman-Vilardi	Ing. R.A. Palacios (UBA)
	Pinto	S. Estero	29°14'S-62°33'W	Saidman-Vilardi	Ing. R.A. Palacios (UBA)
	Sarmiento	S. Estero	28°20'S-63°20'W	Saidman-Vilardi	Ing. R.A. Palacios (UBA)
<i>P. vinalillo</i>	7 de Abril	Tucumán	26°18'S-64°30'W	Saidman-Vilardi	Ing. R.A. Palacios (UBA)
<i>P. chilensis</i>	Talampaya	La Rioja	29°45'S-67°01'W	U. Karlin-R. Coirini	Ing. R.A. Palacios (UBA)
	Belén	Catamarca	27°39'S-67°02'W	R. Coirini	Ing. R.A. Palacios (UBA)
	La Higuera	San Luis	33°28'S-66°36'W	H. Capurro	Ing. R.A. Palacios (UBA)
	Patquía	La Rioja	30°02'S-66°52'W	J. Joseau	Ing. R.A. Palacios (UBA)
<i>P. alpataco</i>	R152Km95	La Pampa	37°28'S-65°40'W	Saidman-Vilardi	Ing. P. Steibel y H. Troiani
<i>P. caldenia</i>	R152Km95	La Pampa	37°28'S-65°40'W	Saidman-Vilardi	Ing. P. Steibel y H. Troiani
<i>P. affinis</i>	Hasenkamp	E. Ríos	31°31'S-59°50'W	F. Mollard	Ing. R.A. Palacios (UBA)
<i>P. velutina</i>	Santa Rita	Arizona,USA	32°05'N-110°57'W	J. Evans	J. Evans (USDA)
<i>P. glandulosa</i>	Weslaco	Texas,USA	26°09'N-98°00'W	J. Evans	J. Evans (USDA)
	La Copita	Texas,USA	27°45'N-98°04'W	J. Evans	J. Evans (USDA)
	Frio Co	Texas,USA	29°02'N-99°01'W	J. Evans	J. Evans (USDA)
	Bell Co	Texas,USA	31°05'N-97°21'W	J. Evans	J. Evans (USDA)
<i>A. aroma</i>	Huilla Catina	S. Estero	27°32'S-64°06'W	Saidman-Vilardi	Ing. A. Cialdella (Darwinion)

Figura 1.1 Ubicación geográfica de las poblaciones Sudamericanas



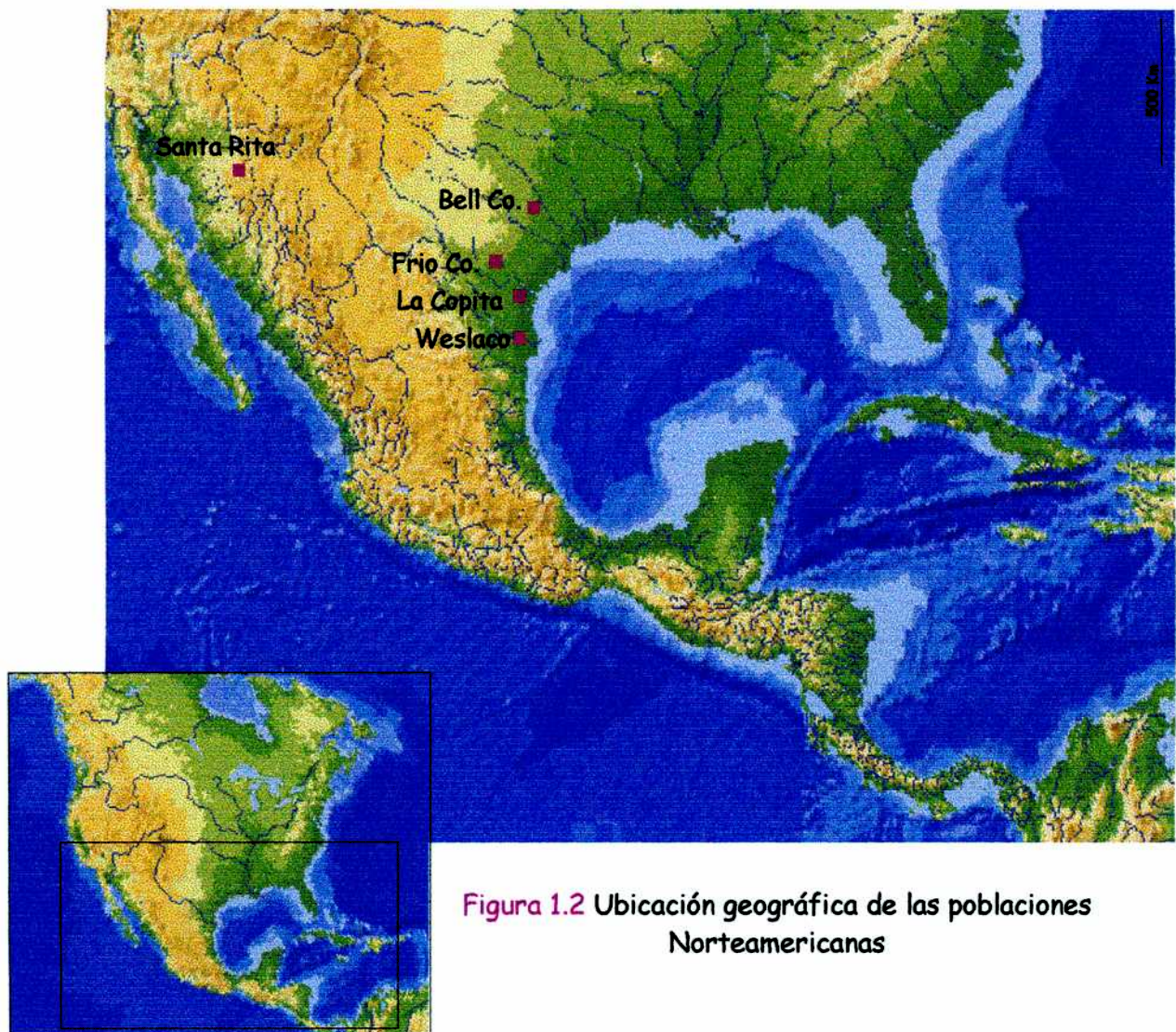


Figura 1.2 Ubicación geográfica de las poblaciones Norteamericanas

Capítulo 2

Variabilidad Genética y Estructura de Poblaciones

I. Introducción

II. Conocimiento Actual En El Género *Prosopis*

III. Variabilidad Y Diferenciación Genética En Poblaciones Norteamericanas. Comparación Con Especies Sudamericanas Previamente Estudiadas.

- a. Resultados
- b. Discusión

IV. Variabilidad Y Diferenciación Genética En Especies Sudamericanas De Las Secciones *Monilicarpa*, *Strombocarpa* Y *Algarobia*.

- a. Resultados
- b. Discusión

V. Sistema De Apareamiento

- a. Resultados
- b. Discusión

I. Introducción

Las especies de *Prosopis* que presentan importancia económica han comenzado a explotarse de forma no racional en los últimos años causando la extinción de bosques extensos que constituyen una parte significativa de nuestra riqueza natural renovable. La conservación de la diversidad biológica se basa en preservar la variabilidad genética. Las poblaciones que presentan menores valores de diversidad tendrán mayor dificultad para soportar condiciones cambiantes del medio y menor probabilidad de poder ser conservadas eficientemente. El conocimiento de la variabilidad, diferenciación y estructura genética de las poblaciones constituye un aspecto muy importante desde el punto de vista del mejoramiento genético y la conservación del recurso. Dicha información permite emprender planes de mejoramiento para características beneficiosas heredables y diseñar estrategias de muestreo más eficientes a fin de capturar la mayor parte de la diversidad existente dentro de los taxa evitando de este modo la pérdida de bosques naturales.

El estudio de los niveles de variabilidad genética presente en las poblaciones naturales es importante también para estudiar procesos evolutivos. El surgimiento de montañas, la aparición de ríos, etc. son procesos naturales que, junto a las alteraciones producidas por el hombre en la naturaleza, pueden provocar aislamiento y fragmentación en las poblaciones. En *Prosopis*, los incendios, la deforestación y explotación exhaustiva de los ambientes naturales son fenómenos que a lo largo del tiempo pueden provocar pérdida en la diversidad genética.

Los niveles de variabilidad genética y la estructura de las poblaciones suelen evaluarse con índices que pueden ser analizados en combinación con características biológicas tales como el tipo de fecundación, el modo de polinización y la duración de los intervalos poblacionales (Gibson y Hamrick 1991, Brown y Allard 1970, Loveless y Hamrick 1984, Hamrick *et al*/1993). Los índices mas utilizados (Hedrick 1983 pag. 65) son el porcentaje de loci polimórficos (P), la heterocigosis media (H) y el número medio de alelos por locus (A) (Apéndice 2A pag. 127).

La estructura genética de una población toma en cuenta la distribución de la variación genética que resulta de la interacción de los procesos microevolutivos tales como la migración, mutación, selección y deriva. La estructura poblacional suele analizarse a través de los estadísticos F desarrollados por Wright (1951) y reexaminados por Weir y Cockerham (1984). Estos son tres coeficientes: F_{IT} , F_{ST} y F_{IS} que pueden ser relacionados entre sí (Apéndice 2B pag. 127). El F_{IT} estima la desviación de la panmixia del conjunto global de las subpoblaciones, el F_{ST} es una medida de la diferenciación genética entre subpoblaciones y toma siempre un valor positivo y por último el F_{IS} que estima el grado de endogamia dentro de una subpoblación. Los valores de F_{IS} y F_{IT} varían entre -1 y 1. Los F_{IS} positivos indican que existe un exceso de homocigotas y los valores negativos indican la ocurrencia de un exceso de heterocigotas. Se espera que F_{ST} varíe entre 0 y 1 a medida que la diferenciación aumenta.

El flujo génico es una fuerza que tiende a homogeneizar la variabilidad genética entre poblaciones y subpoblaciones. En las plantas los genes pueden moverse debido al movimiento del polen o de las semillas. Las especies con

movimiento de genes restringido presentan mayor diferenciación genética que las especies con amplia dispersión de polen y semillas (Brown 1979). Dado que es muy difícil medir el flujo génico de modo directo en poblaciones naturales de árboles, se utilizan métodos indirectos para estimar el número de migrantes que efectivamente entran en una población por generación (Nm).

Los métodos indirectos que se utilizan para estimar el flujo génico parten de las frecuencias alélicas de diferentes marcadores (Neigel 1997). Wright (1951) ha descrito un método para estimar Nm que utiliza el índice F_{ST} y se basa en distribución de alelos comunes. Por otro lado, Slatkin (1985) describió otro método que se basa en la distribución de los alelos exclusivos. Las estimas obtenidas en árboles y arbustos por ambas metodologías se correlacionan significativamente (Hamrick y Loveless 1989) a pesar de que el modelo de Wright (1951) ha sido discutido en los últimos años (Bossart y Pashley Prowell 1998, Hutchinson y Templeton 1999, Whitlock y McCauley 1999). Sin embargo, dado que es difícil ó prácticamente imposible marcar el polen o semillas de árboles para medir directamente el flujo génico los métodos indirectos resultan muy útiles.

De los parámetros utilizados para estudiar la estructura de las poblaciones, el F_{IS} mide el exceso o defecto de homocigotas en una población (endogamia). Este índice está estrechamente relacionado con el sistema de apareamiento de las especies (Brown y Allard 1970, Loveless y Hamrick 1984, Hamrick y Loveless 1986, Gibson y Hamrick 1991) el cual ha sido definido como el proceso que dirige la fusión de gametas dando lugar al genotipo de los individuos de la siguiente generación (Clegg 1980). Brown (1990) ha caracterizado los sistemas de apareamiento que ocurren en las plantas dentro

de cinco clases: predominantemente autógamas o de autofecundación, predominantemente alógamas o de fecundación cruzada, mezcla de ambas, apomixis y autógamas intragametofíticas.

Es posible explicar el sistema de apareamiento que ocurre a través del estudio espacial y temporal de la estructura genética de sus poblaciones. La ocurrencia de autofecundación dará lugar a una estructura genética temporal y espacialmente constante en las poblaciones, mientras que la fecundación cruzada provocará cambios o fluctuaciones en la estructura genética de las poblaciones a lo largo del tiempo (Godt y Hamrick 1993, Turner *et al* 1982). En general, la autofecundación producirá niveles bajos de diferenciación entre las semillas de un individuo y niveles relativamente mas altos de heterogeneidad entre las progenies de diferentes individuos. Por el contrario, la ocurrencia de fecundación cruzada y paternidad múltiple dará lugar a mayores niveles de variación entre la progenie de un mismo individuo y una menor variación entre las progenies de diferentes individuos.

En el pasado, el sistema de apareamiento en plantas ha sido inferido a partir de la morfología floral o estimado a través de marcadores visibles (Hedrick 1990). En la actualidad, la posibilidad de estudiar variantes bioquímicas para medir directamente el sistema de apareamiento constituye un avance muy importante que permitió el estudio en diferentes especies tales como los árboles tropicales *Ceiba pentalandra* (Bombacaceae), *Platypodium elegans* (Fabaceae), *Beilschmedia pendula* (Lauraceae), *Trichilia tuberculata* (Meliaceae) (Murawski y Hamrick 1991); en *Trillium kamtschaticum* (Liliaceae) (Ohara *et al* 1996); en *Pinus leucodermis* (Morgante *et al* 1991); en *Carapa procera* (Meliaceae) (Doliguez y Joly 1997); en *Lupinus arboreus* (Fabaceae)

(Kittelson y Maron 2000); en *Davinesia suaveolans* y *D. mimosoides* (Young y Brown 1998) y en *Helicteres brevispira* (Franceschinelli y Bawa 2000).

El método mas común para medir el sistema de apareamiento se realiza sobre la base de un modelo de apareamiento mixto, éste supone que puede existir cierta proporción de fecundación cruzada y cierto grado de autofertilización. Los supuestos del modelo mixto (Clegg 1980, Brown *et al* 1985) pueden resumirse de la siguiente forma:

- Cada apareamiento aleatorio ocurre con una probabilidad S de ser por autofecundación y una probabilidad T de ser por fecundación cruzada siendo $S + T = 1$. No se espera apareamiento entre parientes y se supone que S es constante temporal y espacialmente.
- La frecuencia esperada de alelos en el polen es idéntica para todos los individuos madres. Se supone que no hay variación temporal ni espacial en las frecuencias alélicas del polen y que no hay correlación en las frecuencias alélicas del polen causadas por factores tales como la polinización o dispersión del polen.
- La tasa de autofecundación o fecundación cruzada es independiente del genotipo materno es decir, que no hay diferencias genéticas en las tasas de apareamiento.
- Existe segregación mendeliana de los alelos en los individuos heterocigotas maternos tanto en la producción de polen como en la de óvulos. Además cualquier gameta tiene la misma probabilidad de formar cigotas, es decir, que no hay selección gamética.
- No ocurre selección entre la fertilización y la determinación del genotipo de la progenie, es decir, que todos los embriones producidos

por autofecundación o fecundación cruzada tienen igual probabilidad de sobrevivir.

No todas las especies cumplen con la totalidad de los supuestos, pero entender las desviaciones de las estimas brinda una buena idea de los factores que afectan directamente el sistema de apareamiento. Un ejemplo claro es el modo en que el mismo se ve afectado por los diferentes sistemas de polinización. Así, cuando la dispersión es mediada por el viento, la distribución de polen producido por los individuos de la población resulta homogénea en la nube total de polen. Sin embargo, es posible que la nube de polen no sea homogénea cuando la dispersión es mediada por insectos que visitan a las plantas diferencialmente. Otras causas que provocan nubes de polen no homogéneas son las diferencias en la densidad del polen de un árbol en el área de su liberación, la dispersión limitada del mismo, etc.

Tomando en cuenta el modelo de apareamiento mixto es posible estimar de un modo indirecto los parámetros del sistema de apareamiento (Apéndice 2C pag. 128). Los marcadores bioquímicos tales como las isoenzimas permiten estimar la tasa de exogamia multilocus (t_m) y la tasa de exogamia promedio para loci individuales (t_s) que permiten inferir la proporción de fecundación cruzada que ocurre. Las desviaciones del modelo proveen información adicional para el entendimiento del sistema de apareamiento y suelen ser evaluados a través de otros coeficientes. La ocurrencia de diferencias en las tasas de apareamiento entre las plantas madres se mide a través de las correlaciones dentro de los grupos fraternos (r_f) y la variación de frecuencias alélicas entre la nube de polen y las plantas madres a través de la correlación de paternidad por exocruza (r_p).

II. Conocimiento Actual En El Género *Prosopis*

Los niveles de variabilidad genética y la estructura de las poblaciones han sido estudiados en diferentes especies del género *Prosopis* utilizando metodologías tales como la electroforesis de proteínas seminales, la electroforesis de isoenzimas, los RAPD, etc. Muchos de estos estudios se han realizado en especies de la sección Algarobia y un menor número de trabajos involucrando especies de las otras secciones (Saidman 1985, Verga 1995, Burghardt 2000A, 2000B, Julio 2000, Ferreyra 2001, Saidman y Vilardi 1987, Burghardt y Palacios 1991, Keys y Smith 1994, Saidman *et al*/1996).

Tal como se describió en el capítulo 1 pag. 8 la sección Algarobia presenta fuertes evidencias morfológicas de hibridación frecuente entre varias de sus especies (Burkart 1976, Palacios y Bravo 1981, Hunziker *et al*/1986). La aparente ausencia de barreras reproductivas y la alta similitud genética entre especies taxonómicamente buenas a permitido asumir que varias especies de la sección Algarobia que habitan en la Región Biogeográfica Chaqueña serían integrantes de un singameón (Palacios y Bravo 1981). Algunos años mas tarde estas especies han sido denominadas especies cohesivas (Montoya *et al*/1994, Burghardt 1995A, Ferreyra 2001) dada la habilidad para mantener su identidad específica a pesar de la ocurrencia de hibridación.

A nivel isoenzimático, la mayor parte de las especies de Algarobia estudiadas hasta el momento no mostraron loci diagnóstico y presentaron altos niveles de variabilidad genética y bajos niveles de diferenciación entre poblaciones y especies (Saidman 1985, Saidman y Vilardi 1987, 1993, Saidman *et al* 1997, Julio 2000, Ferreyra 2001). A nivel de RAPD, los primeros loci

diagnóstico pudieron ser encontrados (Ferreyra 2001) permitiendo la identificación de *P. alba*, *P. ruscifolia*, *P. nigra* y *P. flexuosa*. En general la variabilidad genética fue alta y la diferenciación genética resultó baja (Ferreyra 2001, Saidman *et al*/1998A, Bessega *et al*/2000A). Ambas evidencias son discordantes con la morfología ya que las bajas distancias genéticas encontradas no están de acuerdo con la gran diferenciación morfológica que muestran las especies; y las asociaciones, basadas en la similitud genética entre las mismas, no se ajustan en ningún caso a las series propuestas por Burkart (1976)(Apéndice 1 pag. 125). La falta de consistencia entre los datos moleculares y morfológicos fue observada también en el análisis de bandas RAPD realizado por Ramírez *et al* (1999) en donde las relaciones fenéticas entre las especies no apoyan las series propuestas y se propone una revisión de las mismas.

En la sección Strombocarpa es diferente; Saidman *et al* (1996) estudiaron cinco especies y pudieron hallar algunos loci diagnósticos entre las mismas. Los niveles de variabilidad genética estimados fueron mas bajos que los presentados por las especies estudiadas de la sección Algarobia y la divergencia genética estimada fue mucho mayor. *P. reptans* y *P. strombulífera* presentaron una similitud genética tan alta que fueron consideradas subespecies o razas geográficas de *P. strombulífera* en lugar de dos especies taxonómicas buenas aunque Burkart (1976), ya había señalado la posibilidad que fuesen subespecies de una misma especie. *P. reptans*, *P. strombulífera* y *P. pubescens* (Sección Strombocarpace) fueron mas parecidas entre sí que con *P. torquata* y *P. ferox*. Estas últimas son más similares a pesar de que la primera pertenece a la serie Strombocarpace y la segunda a la Serie Cavenicarpace.

A diferencia de *Algarobia*, en *Strombocarpa* no se ha descrito la ocurrencia de híbridos interespecíficos ni fenómenos de autoincompatibilidad para ninguna especie y se ha propuesto la ocurrencia de cierto nivel de endogamia. Ambas secciones difieren los niveles de variabilidad genética que presentan aunque en *Strombocarpa* las relaciones entre las especies no se ajustan tampoco a lo esperado según la morfología. La diferencia mostrada por ambas secciones ha llevado a proponer diferentes estrategias adaptativas y mecanismos involucrados en el aislamiento reproductivo y el proceso de especiación para cada una de ellas (Saidman *et al*/1996).

En las especies de la Sección *Algarobia* es posible relacionar la alta variabilidad intraespecífica que se observa y la hibridación interespecífica con la biología floral. Por un largo tiempo se asumía que estas especies eran protóginas (Burkart 1937B, 1952, 1976) y esta propiedad junto con la ausencia de barreras reproductivas claras fue considerada como la principal explicación del sistema de fecundación cruzada que podía explicar los altos niveles de variabilidad genética y las tasas de hibridación interespecífica (Solbrig y Bawa 1975, Solbrig y Cantino 1975, Neff *et al*/1977, Simpson 1977, Simpson *et al*/1977, Hunziker *et al*/1986).

Sin embargo, de acuerdo a resultados mas recientes, estas conclusiones tuvieron que ser revisadas. Los estudios de maduración del polen y producción de néctar en *P. flexuosa*, *P. chilensis* y *P. pugionata* de Genisse *et al* (1990) no están de acuerdo con este punto. Estos autores concluyeron que las flores no son protóginas y que la alta variabilidad que presentan algunas especies de *Algarobia* se debe a un sistema de autoincompatibilidad que no depende de la protoginia. Además Galindo-Almanza *et al* (1992) observaron a través de

estudios de polinización que las poblaciones mejicanas de *P. glandulosa* var *torreyana* y *P. laevigata* son al menos autocompatibles. Algunos años mas tarde Keys y Smith (1994) estudiaron parámetros del sistema de apareamiento utilizando marcadores isoenzimáticos en tres poblaciones de *P. velutina* de Estados Unidos y concluyeron que la tasa de fecundación cruzada es de alrededor del 90% y que ocurre autofecundación en bajas tasas. Por otro lado, estudios de estructura poblacional basados en electroforesis de isoenzimas utilizando el estadístico de *F* de Wright (1951) señalaron una tendencia general al exceso de homocigotas en las semillas coleccionadas en poblaciones naturales (Saidman 1985, Saidman y Vilardi 1987, 1993, Keys y Smith 1994, Julio 2000, Ferreyra 2001) compatible con cierto grado de autofecundación y además con cierto grado de estructura poblacional.

Los objetivos desarrollados en el presente capítulo fueron:

1. Detectar loci diagnósticos para las diferentes especies a través de la técnica de electroforesis de isoenzimas y RAPD.
2. Analizar la variabilidad genética y estructura poblacional en poblaciones naturales.
 - 2.1. Estudiar mediante la técnica de RAPD poblaciones Norteamericanas de *P. glandulosa* y *P. velutina* (USA) y comparar las estimas de variabilidad con especies Sudamericanas previamente estudiadas.
 - 2.2. Analizar isoenzimáticamente poblaciones argentinas de *P. argentina* (Monilicarpa), *P. reptans* (Strombocarpa) y *P. kuntzei* (Algarobia) y comparar las estimas de variabilidad con especies previamente estudiadas.

3. Estimar parámetros del sistema de apareamiento en especies de la Sección Algarobia.

III. Variabilidad y Diferenciación Genética en Poblaciones Norteamericanas Comparación con especies Sudamericanas previamente estudiadas.

IIIa. Resultados

Se analizaron cuatro poblaciones naturales Norteamericanas pertenecientes a *P. glandulosa* (Weslaco, La Copita, Bell Co y Frio Co) y una población de *P. velutina* (Santa Rita). La ubicación geográfica de los sitios de muestreo se presentaron en la Figura 1.2 (pag. 20). Todas las poblaciones se estudiaron por electroforesis de isoenzimas y por la técnica de RAPD (Apéndice 3A y 3B pag. 132).

P. glandulosa y *P. velutina* son especies conocidas como "honey" y "velvet" mesquite respectivamente. Ambas pertenecen a la serie Chilenses (Apéndice 1 pag. 125) y están distribuidas en México y Estados Unidos. *P. glandulosa* es una especie invasora en regiones desérticas y semidesérticas de Norteamérica que presenta una estrategia colonizadora similar a la de *P. ruscifolia* en Argentina (Burkart, 1976).

Se estudiaron nueve sistemas isoenzimáticos (Apéndice 2D pag. 128) analizándose alrededor de 35 individuos por población (indicado como N en la Tabla 2.1) El estudio permitió revelar un total de 27 loci de los cuales nueve fueron monomórficos en las cinco poblaciones estudiadas (*Amp-1*, *Adh-2*, *Idh-2*, *6-Pgd-1*, *Sod-1*, *Sod-2*, *Sod-3*, *Sod-4*, *Sod-5*). En la tabla 2.1 se presentan

aquellos loci que mostraron variación. Cuatro loci resultaron diagnósticos (*Got-3*, *Got-4*, *Prx-4* y *Prx-5*) y permitieron reconocer a *P. velutina* de *P. glandulosa*. Las poblaciones de esta última especie sólo se diferenciaron por sus frecuencias alélicas (Tabla 2.1).

		Población				
Locus	N	<i>P. gla</i> We	<i>P. gla</i> LC	<i>P. gla</i> BC	<i>P. gla</i> FC	<i>P. vel</i> SR
<i>Adh-1</i>	1 ³⁰	0,936	0,950	0,950	1	0,738
D*	1 ²⁸	0,064	0,050	0,050	0	0,262
	1 ²⁴	0	0	0	0	0
<i>Adh-2</i>	2 ²⁰	0	0	0	0	0
D*	2 ¹⁷	1	1	1	1	1
	2 ¹⁴	0	0	0	0	0
<i>Amp-2</i>	2 ⁸⁸	0,417	0,405	0,250	0,381	0,794
M	2 ⁷⁶	0,467	0,392	0,455	0,548	0,206
	2 ⁷⁰	0,116	0,203	0,295	0,071	0
<i>Est-1</i>	1 ⁹³	0,094	0,067	0,289	0,379	0,100
M	1 ⁹²	0,469	0,433	0,500	0,190	0,767
	1 ⁹¹	0,437	0,500	0,211	0,431	0,133
	1 ⁹⁰	0	0	0	0	0
<i>Est-2</i>	2 ⁸⁷	0,750	0,757	1	0,673	0,351
M	0	0,250	0,243	0	0,327	0,649
<i>Est-3</i>	3 ⁸⁵	0,388	0,160	0,423	0,433	0,239
M	0	0,612	0,840	0,577	0,567	0,761
<i>Est-4</i>	4 ⁸¹	0,177	0,030	0,024	0,134	0,487
M	0	0,823	0,970	0,976	0,866	0,513
<i>Got-1</i>	1 ⁷²	0,108	0,099	0,250	0,205	0,116
D	1 ⁶⁹	0,387	0,455	0,544	0,346	0,082
	1 ⁶¹	0	0	0	0	0
	1 ⁷¹	0	0	0	0	0,802
	1 ⁷⁰	0,505	0,446	0,206	0,449	0
<i>Got-2</i>	2 ⁴⁸	0,627	0,821	0,929	0,903	0
D	2 ⁴⁰	0,373	0,179	0,071	0,097	0
	2 ³⁴	0	0	0	0	0
	2 ²⁷	0	0	0	0	0
	2 ⁵⁴	0	0	0	0	1

Tabla 2.1 Continúa.

		<i>P. gla</i> We	<i>P. gla</i> LC	<i>P. gla</i> BC	<i>P. gla</i> FC	<i>P. vel</i> SR
<i>Got-3</i>	3 ⁴⁹	--	--	--	--	1
<i>Got-4</i>	4 ⁴⁴	--	--	--	--	1
<i>Idh-1</i>	1 ¹⁰⁰	0,054	0,072	0,384	0,211	0,167
D*	1 ⁷⁰	0,920	0,714	0,593	0,611	0,833
	1 ⁶³	0,027	0,214	0,023	0,178	0
	1 ⁶⁰	0	0	0	0	0
<i>Idh-2</i>	2 ⁴³	0	0	0	0	0
D*	2 ²⁶	1	1	1	1	1
<i>6Pgd-1</i>	1 ³⁰	0	0	0	0	0
M	1 ²⁶	1	1	1	1	1
<i>6Pgd-2</i>	2 ²³	0	0,028	0,022	0	0
M	2 ²¹	0	0	0	0	0
	0	1	0,972	0,978	1	1
<i>Prx-1</i>	1 ³⁶	0,190	0,520	0,065	0,068	0
M	0	0,810	0,480	0,935	0,932	0
<i>Prx-2</i>	2 ²⁹	1	0,667	0,842	0,719	0
M	0	0	0,333	0,158	0,281	0
<i>Prx-3</i>	3 ²¹	0,561	0,194	0,275	0,111	0
M	0	0,439	0,806	0,725	0,889	0
<i>Prx-4</i>	4 ³⁹	--	--	--	--	1
<i>Prx-5</i>	5 ³²	--	--	--	--	1
<i>Skd-1</i>	1 ²⁴	0,093	0,190	0,250	0,157	0,531
M	1 ²²	0,651	0,429	0,659	0,711	0,469
	1 ¹⁹	0,256	0,381	0,091	0,132	0

Tabla 2.1. Frecuencias alélicas estimadas en todas las poblaciones a partir de los 27 loci isoenzimáticos. M = monomérica, D= dimérica, * = la enzima presentó interacciones alélicas o no alélicas.

Los cuatro "primers" aleatorios utilizados (Apéndice 2E pag. 128) permitieron revelar 46 bandas RAPD que fueron interpretadas como diferentes loci (Figura 2.1). Se estudiaron entre 7 y 24 individuos por población (indicado como N en la Tabla 2.2). Cada banda fue referida con un nombre (locus en la Tabla 2.2) y con su peso molecular (PM(pb) en la Tabla 2.2). La estimación del tamaño de cada fragmento se realizó por comparación con el marcador de peso molecular λ digerido con EcoRI y HindIII que fue sembrado en cada gel simultáneamente (λ en la Figura 2.1).

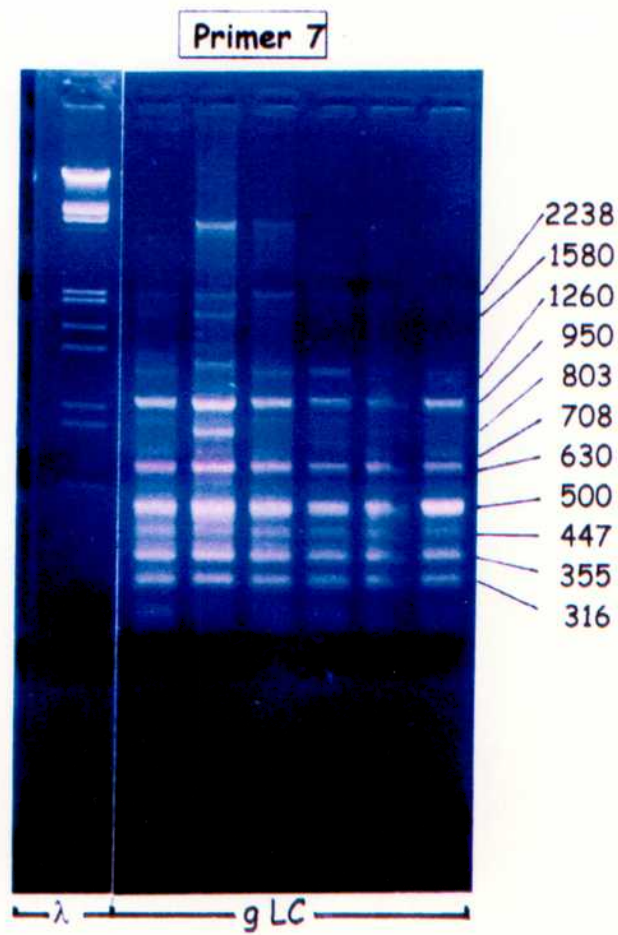
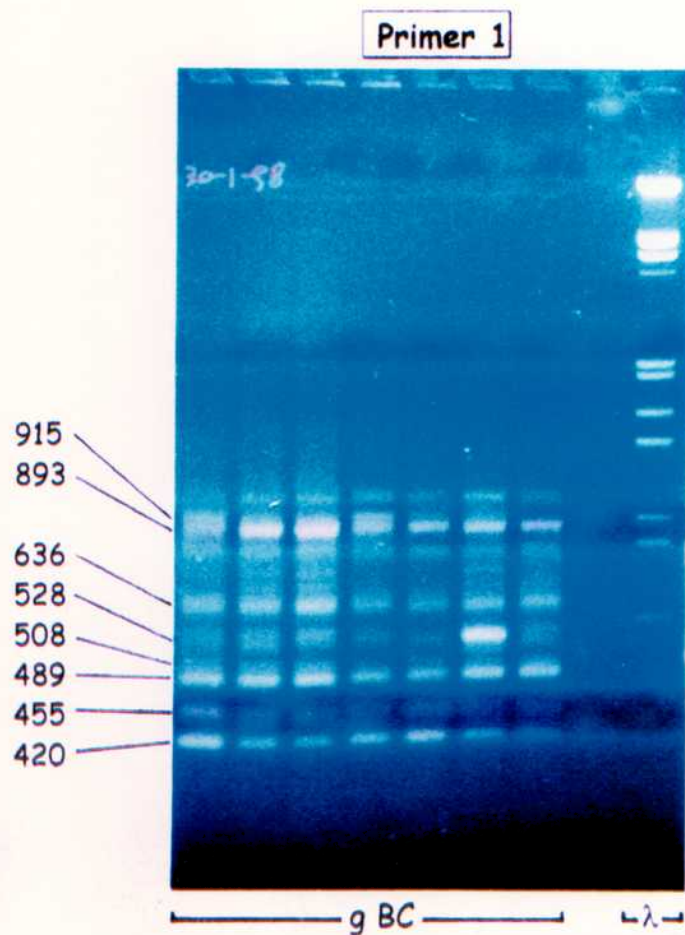
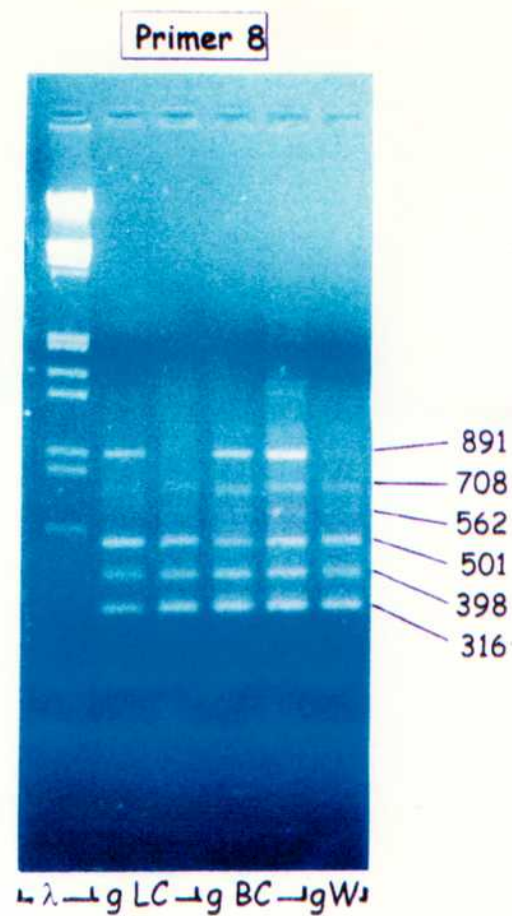
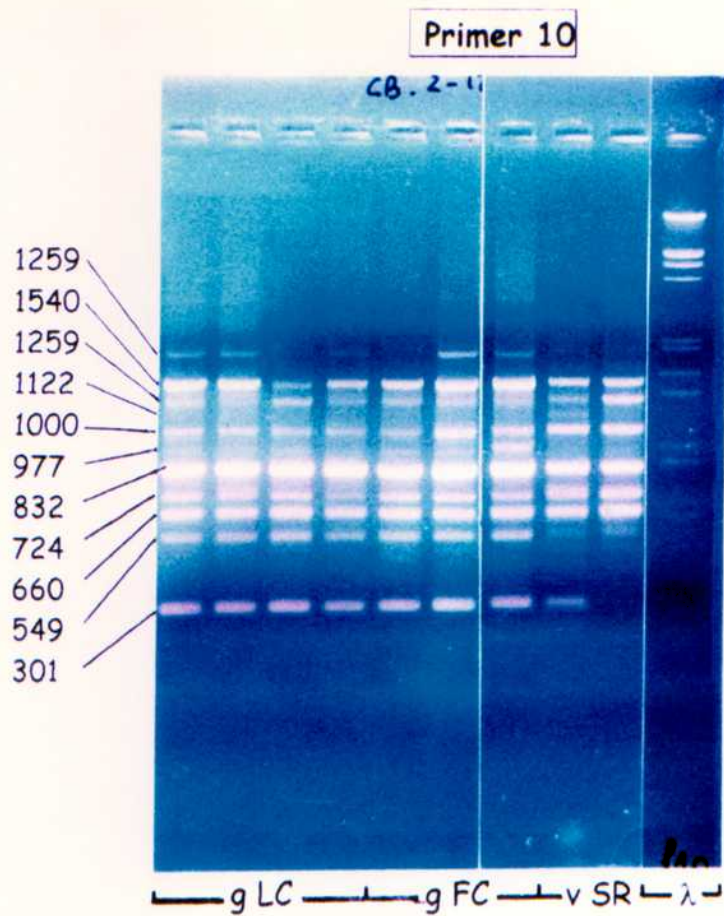


Figura 2.1 Productos de amplificación obtenidos por RAPD.
Se detallan los pesos moleculares (pb) de las bandas analizadas.

Se analizó el posible ligamiento entre todos los loci RAPD (Apéndice 2F pag. 129) y de los 990 pares de comparaciones posibles sólo 7 (0.71%) sugirieron desequilibrio epistático por lo que se consideró que los loci eran independientes. Del total de loci estudiados, 45 resultaron polimórficos entre las poblaciones Norteamericanas (Tabla 2.2).

Locus	PM (pb)	N	Población				
			<i>P.gla</i> LC	<i>P.gla</i> FC	<i>P.gla</i> BC	<i>P.gla</i> WE	<i>P. vel</i> SR
			24	7	13	12	15
01-01	2094		0.074	0	0	0.083	0
01-02	915		0.167	0.375	0.077	0	0
01-03	893		0.556	1	0.692	0.292	0.714
01-04	809		0.074	0	0.038	0	0.179
01-05	694		0.056	0	0.154	0.25	0.464
01-06	626		1	1	1	1	1
01-07	528		0.019	1	0.115	0.083	0
01-08	508		0.019	0.25	0.385	0	0
01-09	489		0.037	1	0.038	0	0
01-10	455		0.426	1	1	1	0.071
01-11	440		0.556	0	0	0.25	0.286
01-12	420		1	0.25	1	1	0.536
07-01	2238		0.024	0	0.038	0	0
07-02	1580		0.048	0.2	0.192	0.167	0.7
07-03	1260		0.762	0.5	0.577	1	0.167
07-04	1000		0	0.1	0.077	0	0
07-05	950		1	1	0.5	1	0
07-06	803		0.548	0.2	1	0.583	0
07-07	708		1	0.2	1	1	0.7
07-08	630		1	1	1	1	0.367
07-09	562		0	0	0	0	0.033
07-10	500		1	0.5	1	1	0.7
07-11	447		0.262	0.3	0.692	0.667	0.033
07-12	355		0.405	1	0.692	0.667	0
07-13	316		0.136	0.3	0	0	0

Tabla 2.2. Continúa.

Locus	PM (pb)	<i>P.gla</i> LC	<i>P.gla</i> FC	<i>P.gla</i> BC	<i>P.gla</i> WE	<i>P. ve</i> /SR
08-01	1000	0	0.063	0.042	0.042	0.1
08-02	891	0.269	0.25	0.083	0.125	0
08-03	708	0.115	1	0.417	0.417	0.067
08-04	562	0.135	0.5	0.5	0.25	0.3
08-05	501	0.308	0.375	0.042	0.167	0.067
08-06	398	0.769	1	0.667	1	0.7
08-07	316	1	1	0.667	1	1
10-01	3162	0.352	0.063	0.115	0.042	0.464
10-02	2239	0.352	0.063	0.115	0.042	0.464
10-03	1540	0.704	0.5	1	1	1
10-04	1259	0.426	0.5	0.269	0.5	0.036
10-05	1122	0.019	0	0.077	1	0.036
10-06	1000	0.481	1	0.385	0	0.036
10-07	977	0.444	0.375	0	0	0.143
10-08	932	0.778	1	1	1	1
10-09	724	1	1	1	1	0.179
10-10	660	1	1	1	1	0.321
10-11	549	0.704	1	1	0.667	0.536
10-12	331	0.185	0.125	0.385	0.417	0.036
10-13	301	1	1	0.692	0.667	0.607
10-14	275	0.019	0	0	0	0

Tabla 2.2. Frecuencias alélicas estimadas por el método de Lynch y Milligan (1994) en todas las poblaciones a partir de los 46 loci RAPD.

Las frecuencias alélicas estimadas por ambas metodologías (Apéndice 2G pag. 129) permitieron analizar la variabilidad genética a través de los parámetros: Número medio de alelos por loci (*A*), Porcentaje de loci polimórfico (*P*) y Heterocigosis media (*H*) (Apéndice 2A pag. 127). En la Tabla 2.3 se presentan las estimas correspondientes, *N* indica el tamaño promedio de la muestra estudiada y *SE* se refiere al error estándar.

Las estimas de variabilidad genética en especies Norteamericanas fueron altas y similares en todos los casos. Los valores de *A* variaron entre 1.4 y 1.8 cuando se analizaron las isoenzimas y entre 1.4 y 1.7 cuando se estudiaron las bandas RAPD. Los valores de *P* oscilaron entre 33.3% y 48.1% cuando

fueron estimados a través de isoenzimas y entre 37.8% y 55.6% con la otra metodología. Los rangos de H resultaron 0.127 - 0.203 y 0.151 - 0.215 respectivamente.

	ISOENZIMAS				RAPD			
	N (SE)	A (SE)	P (SE)	H (SE)	N (SE)	A (SE)	P (SE)	H (SE)
<i>P. glandulosa</i> La Copita	34.7 (2.7)	1.8 (0.2)	48.1 (9.6)	0.203 (0.048)	24.1 (0.4)	1.7 (0.1)	55.6 (7.4)	0.215 (0.030)
<i>P. glandulosa</i> Frio Co	34.6 (2.2)	1.6 (0.1)	48.1 (9.6)	0.177 (0.043)	7.1 (0.2)	1.4 (0.1)	44.4 (7.4)	0.186 (0.034)
<i>P. glandulosa</i> Bell Co	36.7 (2.2)	1.7 (0.2)	40.7 (9.4)	0.161 (0.043)	12.8 (0.1)	1.6 (0.1)	48.9 (7.4)	0.192 (0.031)
<i>P. glandulosa</i> Weslaco	44.7 (3.3)	1.7 (0.2)	44.4 (9.5)	0.187 (0.047)	12 (0.0)	1.4 (0.1)	37.8 (7.2)	0.151 (0.030)
<i>P. velutina</i> Santa Rita	30.5 (2.4)	1.4 (0.1)	33.3 (9.1)	0.127 (0.036)	14.4 (0.1)	1.6 (0.1)	48.9 (7.4)	0.192 (0.030)

Tabla 2.3. Variabilidad genética estimada a partir de 27 loci isoenzimáticos y 46 loci RAPD.

P. velutina resultó menos variable que todas las poblaciones de *P. glandulosa* estudiadas a través de las isoenzimas. Por el contrario cuando la variabilidad fue estimada a través de la técnica de RAPD, la población *P. glandulosa* Weslaco fue la que presentó los menores valores de variabilidad genética aunque las diferencias en los niveles de variación no resultaron estadísticamente significativos ya que los intervalos de confianza se superpusieron en todos los casos.

El grado de diferenciación entre las poblaciones fue estimado a través del coeficiente F_{ST} no jerárquico de Wright (1978) y a partir de éste se estimó el flujo génico para ambos tipos de datos (Apéndice 2B y 2H pag. 127 y 129). Los resultados se señalan en la Tabla 2.4.

	ISOENZIMAS		RAPD	
	F_{ST}	Nm	F_{ST}	Nm
<i>P. glandulosa</i> y <i>P. velutina</i>	0.388**	0.39	0.290**	0.60
<i>P. glandulosa</i>	0.071**	3.27	0.283**	0.63

Tabla 2.4. F_{ST} y Nm estimados a partir de 27 loci isoenzimáticos y 46 loci RAPD.

Los valores de F_{ST} fueron en todos los casos altamente significativos (Apéndice 2I pag. 129) indicando que existe diferenciación genética entre las poblaciones estudiadas. Cuando las poblaciones de *P. glandulosa* y *P. velutina* se analizaron de manera conjunta, las estimas de F_{ST} para ambas metodologías (isoenzimas y RAPD) fueron similares (Tabla 2.4 fila 1). Esto fue confirmado cuando se correlacionaron significativamente ($P= 0.02$) las matrices de F_{ST} a través del test de Mantel ($r= 0.566$) (Apéndice 2J pag. 130). Además, en este caso, el flujo génico estimado indirectamente fue menor a un migrante por generación.

Sin embargo, cuando se analizaron únicamente poblaciones coespecíficas de *P. glandulosa* (Tabla 2.4 fila 2), las estimas de F_{ST} que se obtuvieron por cada metodología resultaron diferentes (isoenzimas=0.071, RAPD=0.283). El Nm estimado a través de los resultados enzimáticos indicaría un mayor flujo génico entre las poblaciones de *P. glandulosa* que el indicado a través de los RAPD.

IIIb. Discusión

La comparación de los patrones isoenzimáticos entre las especies Norteamericanas *P. glandulosa* y *P. velutina* y las Sudamericanas *P. chilensis* (Julio 2000), *P. ruscifolia*, *P. alba*, *P. nigra*, *P. flexuosa* y *P. vinalillo* (Ferreyra 2001) mostró que las variantes alélicas presentadas por especies de ambos

subcontinentes eran las mismas y que éstas sólo diferían en las frecuencias alélicas con la única excepción de *P. velutina* en la que en dos sistemas isoenzimáticos presentaron loci diagnósticos.

El estudio isoenzimático en poblaciones Sudamericanas de *P. ruscifolia*, *P. alba*, *P. nigra*, *P. flexuosa*, *P. vinalillo* y *P. chilensis* mostró que el número promedio de alelos por locus (A) varió entre 1.6 (*P. alba*) y 2.1 (*P. chilensis*), la heterocigosis media lo hizo entre 0.140 (*P. alba*) y 0.332 (*P. chilensis*) y el porcentaje de loci polimórficos (P), entre 37.5 % (*P. alba*) y 66.7% (*P. chilensis*). La comparación de los resultados previos y los aquí presentados permite concluir que los niveles de variabilidad genética estimados en las especies Norteamericanas son similares a los presentados por las Sudamericanas de la sección Algarobia hasta ahora estudiadas.

Las frecuencias alélicas de los patrones de RAPD de las especies Norte y Sudamericanas no fueron analizadas de forma conjunta en una misma matriz ya que las bandas no fueron obtenidas en las mismas condiciones experimentales. Sin embargo, las estimas de variabilidad genética (A, P, H) para cada grupo fueron comparadas.

Las poblaciones Sudamericanas de *P. ruscifolia*, *P. alba*, *P. nigra*, *P. flexuosa* y *P. vinalillo* (Ferreyra 2001) mostraron que el porcentaje de loci polimórfico (P) varió entre 25% y 50% mientras que la heterocigosis media (H) lo hizo entre 0.123 y 0.246. La población más variable había resultado *P. ruscifolia* (Sarmiento, Sgo. del Estero) y la menos variable *P. flexuosa* (Km1150, Sgo. del Estero). Para las Norteamericanas, los rangos de los RAPD variaron de forma similar, mostrando también por esta metodología que los

niveles de variabilidad genética estimados en las especies Norteamericanas son semejantes a los presentados por las especies Sudamericanas de la sección Algarobia estudiadas.

Los estudios de diferenciación genética a través del F_{ST} en las especies argentinas *P. ruscifolia*, *P. alba*, *P. nigra*, *P. flexuosa* y *P. vinalillo* (Ferreyra 2001) mostraron que el F_{ST} promedio para todas las poblaciones fue de 0.364 indicando que existe diferenciación genética entre ellas. Las estimas de flujo génico (Nm) entre las mismas fue menor a un migrante por generación al analizar los 27 loci isoenzimáticos. Por el contrario, cuando se calculó el flujo génico entre poblaciones de la misma especie se observó que el Nm era mayor a un migrante por generación en todas las especies, mostrando cada una, valores de F_{ST} significativos. El análisis por la técnica de RAPD de 28 loci (Ferreyra 2001) mostró un valor de F_{ST} promedio para todas las poblaciones altamente significativo y la estima de Nm entre todas las especies fue de 0.3 indicando un flujo génico menor a un migrante por generación. Cuando el estudio se hizo analizando poblaciones coespecíficas, los valores de F_{ST} fueron significativos o altamente significativos y el Nm fue diferente en las distintas especies. Mientras que éste fue mayor a 1 en *P. alba* (1.5) y *P. flexuosa* (3.9), resultó menor a 1 en *P. nigra* (0.29) y en *P. ruscifolia* (0.7).

El nivel de diferenciación y flujo génico mostrado por las poblaciones de *P. glandulosa* a través de la electroforesis de isoenzimas ($F_{ST} = 0.07$ y $Nm = 3.2$) muestran a esta especie semejante a cualquiera de las especies Sudamericanas incluidas en el estudio de Ferreyra. Sin embrago, los valores de diferenciación y flujo génico obtenidos por RAPD ($F_{ST} = 0.28$ y $Nm = 0.6$) son mas similares a los presentados por *P. ruscifolia* y a los de *P. nigra* que a los de

las restantes especies. Las estimas de flujo génico obtenidas a partir de RAPD deben ser consideradas cuidadosamente dado que esta metodología sobreestima las diferencias al no permitir distinguir a los homocigotas de los heterocigotas. Sin embargo, este resultado podría estar apoyado por la presencia de ecotipos que han sido descriptos tanto para *P. ruscifolia* (Morello *et al*/1971) como para *P. glandulosa* (Peacock y McMillan, 1965).

IV. Variabilidad Y Diferenciación Genética En Especies Sudamericanas De Las Secciones Monilicarpa, Strombocarpa Y Algarobia

IVa. Resultados

Se analizaron 9 sistemas isoenzimáticos (Apéndice 2D pag. 128) en dos poblaciones naturales de *P. argentina* (Monilicarpa), una de *P. kuntzei* (Algarobia) y una de *P. reptans* (Strombocarpa). Estas fueron comparadas con poblaciones argentinas de *P. chilensis*, *P. alba*, *P. flexuosa*, *P. nigra*, *P. ruscifolia* y *P. vinalillo* previamente estudiadas (Julio 2000, Ferreyra 2001) así como también con las Norteamericanas descriptas en la sección anterior del presente capítulo *P. glandulosa* y *P. velutina*. En las Figuras 1.1 y 1.2 (pag. 19 y 20) se presentan los sitios de muestreo correspondientes a cada población.

P. argentina es la única especie que conforma la sección Monilicarpa. Suelen ser arbustos de 1.5 a 2 mts de altura. Su principal distribución abarca la Provincia Fitogeográfica del Monte (Cabrera 1976). Desde el punto de vista ecológico es una especie que se encuentra en médanos móviles o semifijos con condiciones ambientales bastantes definidas. Es tolerante al stress hídrico y

se desarrolla bien en suelos con escasos nutrientes (Villagra 1995,1997, Roig 1993) .

P. kuntzei pertenece a la sección Algarobia Serie Sericanthae. Son árboles de 4 a 10 mts de alto, subáfilo debido a sus hojas tempranamente caducas y con ramas epinescentes. Se comporta como una bioforma de savanna adaptada a largos períodos de sequía (Roig 1993). Se ubica desde el norte de Paraguay y este de Bolivia hasta el centro de Argentina (norte de Córdoba, Santa Fé y Corrientes). Según Adámoli (1973), es preferentemente del Chaco húmedo. En el Chaco seco, área subóptima, presenta aspecto hórrido con ramas mas gráciles y flexibles. Su madera es muy dura y posee el mayor poder calorífico dentro del género (Tortorelli 1956). Hasta el momento no han sido descritos híbridos interespecíficos que la involucraran.

P. reptans pertenece a la sección Strombocarpa, Serie Strombocarpae. Son arbustos que miden de 0.3 a 0.5 mts de altura que presentan estructuras de tipo raíces geminíferas o rizomas para invadir el suelo. Existen dos variedades: *P. reptans* var. *reptans* que está distribuida en el centro de Argentina y aparentemente también se encuentra en Perú y *P. reptans* var. *cinerascens* que esta ubicada en USA y México. *P. reptans* var. *reptans* de Perú ha sido descripta como el nexa entre las áreas ocupadas por ambas variedades (Burkart 1976).

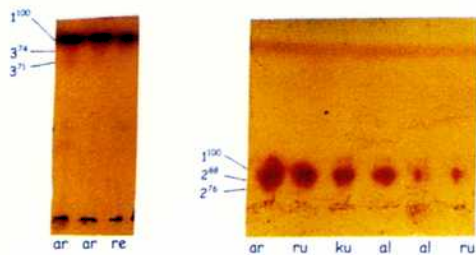
La mejor forma para poder estimar el número de loci y alelos por locus es efectuando cruzamientos controlados y analizando la segregación. Dado que para las especies arbóreas ésto es muy difícil en base a tiempos reales, la

determinación estuvo basada en la comparación de la velocidad de migración relativa de cada banda.

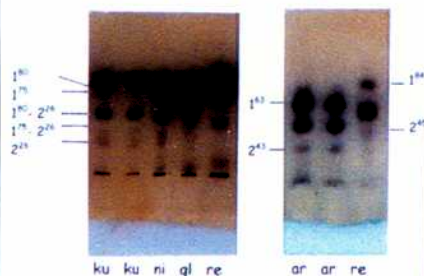
Estudios previos isoenzimáticos en especies pertenecientes a las secciones *Strombocarpa* y *Algarobia* señalaron que las movilidades de las enzimas de ambas secciones eran muy diferentes para casi todos los sistemas ensayados con excepción de la enzima Superóxido dismutasa ó SOD (Saidman 1985, Hunziker *et al* 1986, Saidman *et al* 1996). Sobre la base de estos antecedentes, se consideraron como bandas codificadas por el mismo gen aquellas que presentaban velocidad de migración similar y fueron interpretadas como genes distintos, las bandas que presentaban velocidad de migración relativa diferente. De acuerdo con esto, en el presente estudio no se ha realizado un estricto análisis de la homología entre las bandas de las secciones.

El análisis conjunto de *P. kuntzei* (Tacana), *P. reptans* (Herrera) y *P. argentina* (Tinogasta y Tucunuco) con las poblaciones previamente estudiadas permitió interpretar 47 loci isoenzimáticos. En la Figura 2.2 se presentan los loci encontrados en cada especie. Allí se indican los alelos encontrados en cada una de ellas junto a algunos zimogramas. Los loci isoenzimáticos fueron denominados de acuerdo al orden decreciente de velocidad de migración respetando los trabajos ya publicados a fin de simplificar futuras interpretaciones. Las variantes alélicas fueron nombradas de acuerdo a la velocidad de migración relativa al frente de bromofenol. A continuación (pag. 46) se describe la interpretación de cada sistema isoenzimático que fue considerada en el presente trabajo:

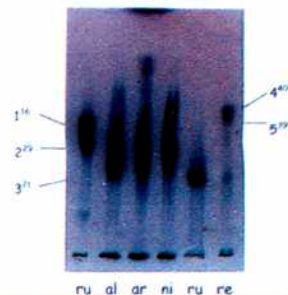
AMP	Amp-1	Amp-2	Amp-3
<i>P. nig</i> - <i>P. fle</i>			
<i>P. alb</i> - <i>P. rus</i>	1 ¹⁰⁰	2 ⁸⁸ - 2 ⁷⁶ - 2 ⁷⁰	--
<i>P. chi</i> - <i>P. vin</i>			
<i>P. gla</i> - <i>P. vel</i>			
<i>P. arg</i>	1 ¹⁰⁰	2 ⁸⁸	3 ⁷⁷ - 3 ⁷⁴ - 3 ⁷¹
<i>P. rep</i>	1 ¹⁰⁰	2 ⁸⁸	3 ⁷⁷ - 3 ⁷¹
<i>P. kun</i>	1 ¹⁰⁰	2 ⁸⁸ - 2 ⁷⁶ - 2 ⁷⁰	--



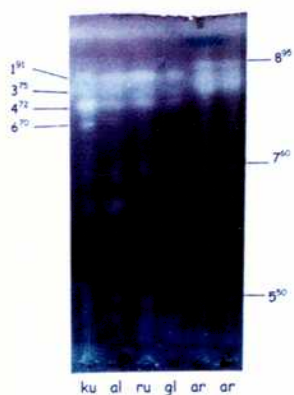
IDH	Idh-1	Idh-2
<i>P. rus</i>	1 ⁷⁰ - 1 ⁶³ - 1 ⁶⁰	2 ²⁶
<i>P. alb</i>	1 ⁷⁵ - 1 ⁷⁰ - 1 ⁶³	2 ⁴³ - 2 ⁴⁰
<i>P. chi</i>	1 ⁷⁵ - 1 ⁷⁰ - 1 ⁶³	2 ⁴³ - 2 ⁴⁰ - 2 ²⁶
<i>P. nig</i>	1 ⁷⁵ - 1 ⁷⁰ - 1 ⁶³ - 1 ⁶⁰	2 ²⁶
<i>P. fle</i>	1 ⁷⁵ - 1 ⁷⁰ - 1 ⁶³ - 1 ⁶⁰	2 ⁴³
<i>P. vin</i>	1 ⁷⁵ - 1 ⁷⁰ - 1 ⁶³	2 ⁴³
<i>P. gla</i>	1 ⁷⁵ - 1 ⁷⁰ - 1 ⁶³	2 ²⁶
<i>P. vel</i>	1 ⁷⁵ - 1 ⁷⁰	2 ²⁶
<i>P. kun</i>	1 ⁸⁰	2 ²⁶
<i>P. arg</i>	1 ⁶³	2 ⁴³
<i>P. rep</i>	1 ⁸⁶ - 1 ⁸⁴ - 1 ⁸²	2 ⁴⁵



PRX	<i>P. arg</i> - <i>P. kun</i> <i>P. alb</i> - <i>P. rus</i> <i>P. fle</i> - <i>P. nig</i> <i>P. gla</i> - <i>P. vin</i> <i>P. chi</i>	<i>P. vel</i>	<i>P. rep</i>
<i>Prx-4</i>	--	--	4 ⁴⁰
<i>Prx-5</i>	--	--	5 ³⁹ - 5 ³⁸ - 5 ³⁷
<i>Prx-1</i>	1 ³⁶ - 1 ⁰	--	--
<i>Prx-6</i>	--	6 ³²	--
<i>Prx-2</i>	2 ²⁹ - 2 ⁰	--	--
<i>Prx-7</i>	--	7 ²⁹	--
<i>Prx-3</i>	3 ²¹ - 3 ⁰	--	--



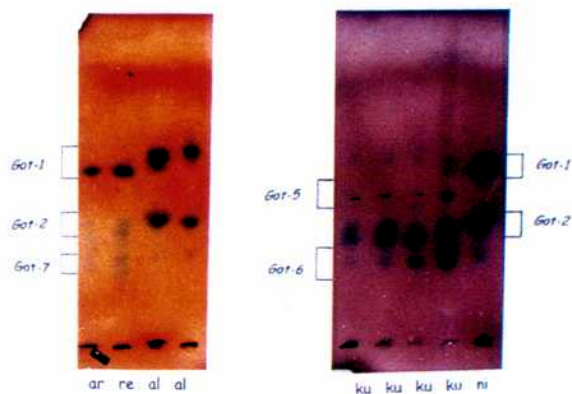
SOD	<i>P. rep</i> - <i>P. gla</i> <i>P. vel</i> - <i>P. nig</i> <i>P. fle</i> - <i>P. rus</i> <i>P. alb</i> - <i>P. chi</i>	<i>P. kun</i>	<i>P. arg</i>
<i>Sod-8</i>	--	--	8 ⁹⁵
<i>Sod-1</i>	1 ⁹¹	1 ⁹¹	1 ⁹¹
<i>Sod-2</i>	2 ⁸³	--	2 ⁸³
<i>Sod-3</i>	3 ⁷⁵	3 ⁷⁵	3 ⁷⁵
<i>Sod-4</i>	4 ⁷²	4 ⁷²	4 ⁷²
<i>Sod-6</i>	--	6 ⁷⁰	--
<i>Sod-7</i>	--	--	7 ⁶⁰
<i>Sod-5</i>	5 ⁵⁰	--	5 ⁵⁰



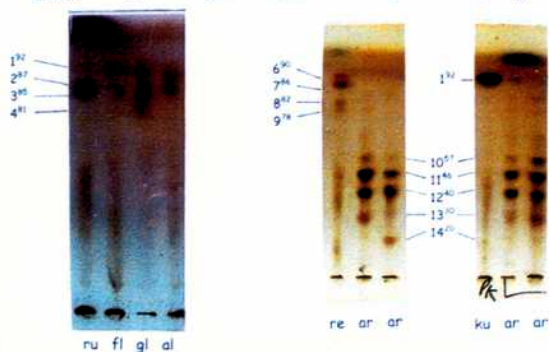
6-PGD	6-Pgd-1	6-Pgd-2
<i>P. nig</i> - <i>P. fle</i>	1 ³⁰ - 1 ²⁶	2 ³³ - 2 ²¹ - 2 ⁰
<i>P. alb</i> - <i>P. rus</i>		
<i>P. chi</i> - <i>P. vin</i>	1 ³⁰ - 1 ²⁶ - 1 ²³	2 ³³ - 2 ²¹ - 2 ⁰
<i>P. gla</i>	1 ²⁶	2 ³³ - 2 ⁰
<i>P. vel</i>	1 ²⁶	2 ⁰
<i>P. kun</i> - <i>P. rep</i>	1 ³⁰	2 ⁰
<i>P. arg</i>	1 ³⁰ - 1 ²⁶ - 1 ⁰	2 ³³ - 2 ⁰



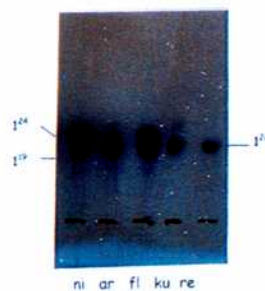
GOT	<i>P. alb</i> - <i>P. rus</i> <i>P. fle</i> - <i>P. nig</i> <i>P. gla</i> - <i>P. chi</i> <i>P. vin</i>	<i>P. vel</i>	<i>P. arg</i>	<i>P. kun</i>	<i>P. rep</i>
<i>Got-1</i>	1 ^{72.0} - 1 ^{69.0} - 1 ^{61.0}	1 ^{72.0} - 1 ^{69.0} - 1 ^{71.0}	1 ^{69.5} - 1 ^{68.5}	1 ^{71.5}	1 ^{68.0} - 1 ^{67.0}
<i>Got-2</i>	2 ⁴⁸ - 2 ⁴⁰ 2 ³⁴ - 2 ²⁷	2 ⁵⁴	--	2 ³⁹ - 2 ³⁷	2 ³⁸ - 2 ³⁶
<i>Got-3</i>	--	3 ⁴⁹	--	--	--
<i>Got-4</i>	--	4 ⁴⁴	--	--	--
<i>Got-5</i>	--	--	--	5 ⁵⁰	--
<i>Got-6</i>	--	--	--	6 ²⁵ - 6 ²⁶ - 6 ⁰	--
<i>Got-7</i>	--	--	7 ²⁴ - 7 ²²	--	--



EST	<i>P. vel</i> - <i>P. fle</i> <i>P. rus</i> - <i>P. nig</i>	<i>P. alb</i>	<i>P. chi</i> <i>P. vin</i>	<i>P. gla</i>	<i>P. kun</i>	<i>P. arg</i>	<i>P. rep</i>
<i>Est-1</i>	1 ⁹³ - 1 ⁹² - 1 ⁹¹	1 ⁹² - 1 ⁹¹	1 ⁹² - 1 ⁹¹ - 1 ⁹⁰	1 ⁹³ - 1 ⁹² - 1 ⁹¹ - 1 ⁹⁰	1 ⁹²	--	--
<i>Est-2</i>	2 ⁸⁷ - 2 ⁰	2 ⁸⁷ - 2 ⁰	2 ⁸⁷ - 2 ⁰	2 ⁸⁷ - 2 ⁰	--	--	--
<i>Est-3</i>	3 ⁸⁵ - 3 ⁰	3 ⁸⁵ - 3 ⁰	3 ⁸⁵ - 3 ⁰	3 ⁸⁵ - 3 ⁰	--	--	--
<i>Est-4</i>	4 ⁸¹ - 4 ⁰	4 ⁸¹ - 4 ⁰	4 ⁸¹ - 4 ⁰	4 ⁸¹ - 4 ⁰	--	--	--
<i>Est-6</i>	--	--	--	--	--	6 ⁹⁰	--
<i>Est-7</i>	--	--	--	--	--	7 ⁸⁶	--
<i>Est-8</i>	--	--	--	--	--	8 ⁸²	--
<i>Est-9</i>	--	--	--	--	--	9 ⁷⁸	--
<i>Est-10</i>	--	--	--	--	--	10 ⁵⁷	--
<i>Est-11</i>	--	--	--	--	--	11 ⁴⁶	--
<i>Est-12</i>	--	--	--	--	--	12 ⁴⁰	--
<i>Est-13</i>	--	--	--	--	--	13 ³⁰	--
<i>Est-14</i>	--	--	--	--	--	14 ²⁰	--



SKD	<i>Skd-1</i>
<i>P. rus</i> - <i>P. vel</i>	1 ²⁴ - 1 ²²
<i>P. gla</i> - <i>P. vin</i>	1 ²⁴ - 1 ²² - 1 ¹⁹
<i>P. nig</i> - <i>P. alb</i>	
<i>P. chi</i>	1 ²⁴ - 1 ²² - 1 ¹⁹ - 1 ¹⁷
<i>P. fle</i>	1 ²²
<i>P. kun</i>	1 ²²
<i>P. arg</i>	1 ²² - 1 ¹⁹
<i>P. rep</i>	1 ²²



ADH	<i>Adh-1</i>	<i>Adh-2</i>
<i>P. rus</i>	1 ³⁰ - 1 ²⁸	2 ²⁰ - 2 ¹⁷
<i>P. vel</i> - <i>P. gla</i>	1 ³⁰ - 1 ²⁸	2 ¹⁷
<i>P. vin</i> - <i>P. alb</i>		
<i>P. chi</i>	1 ³³ - 1 ³⁰ - 1 ²⁸ - 1 ²⁴	2 ²⁰ - 2 ¹⁷ - 2 ¹⁴
<i>P. fle</i> - <i>P. nig</i>	1 ³⁰ - 1 ²⁸ - 1 ²⁴	2 ¹⁷
<i>P. kun</i>	1 ²⁸	2 ²⁰
<i>P. arg</i>	1 ²⁸	2 ²⁰
<i>P. rep</i>	1 ²⁹	2 ¹⁴

**Figura 2.2. Zimogramas para los distintos
sistemas isoenzimáticos.
Se detalla la interpretación de loci
y alelos del presente trabajo.**

ADH: Esta enzima sería dimérica y presentaría interacciones alélicas y no alélicas (Saidman 1985, Verga 1995, Bessega 1997, Julio 2000, Ferreyra 2001). Se observaron dos zonas de actividad para todas las especies y fueron interpretadas como dos genes diferentes (*Adh-1* y *Adh-2*). En *Adh-1* se detectaron 5 alelos posibles que fueron variables en todas las poblaciones excepto en *P. kuntzei*, *P. argentina* y *P. reptans*. *P. kuntzei* presentó fijado el alelo 1²⁸ mientras que las otras dos especies presentaron únicamente el alelo 1²⁹. *Adh-2* fue menos variable y presentó tres alelos. En la mayoría de las poblaciones estuvo fijada alguna variante (Figura 2.2 y Apéndice 4 pag. 139).

SKD: Una única zona de actividad pudo ser detectada y se interpretó como un único gen codificante para una enzima monomérica en concordancia con estudios previos (Verga, 1995, Bessega 1997, Ferreyra 2001). Tres (1²⁴, 1²², 1¹⁹) de las cuatro variantes alélicas encontradas estuvieron en *P. alba*, *P. chilensis*, *P. nigra*, *P. vinalillo* y *P. glandulosa*. 1²⁴ y 1²² fueron los únicos alelos encontrados en *P. ruscifolia* y *P. velutina*. *P. kuntzei* y *P. reptans* mostraron el alelo 1²² mientras que *P. argentina* presentó este alelo y la variante 1¹⁹ (Figura 2.2 y Apéndice 4 pag. 140)

IDH: Esta sería una enzima dimérica (Verga 1995, Bessega 1997, Ferreyra 2001) con dos loci isoenzimáticos. *Idh-1* presentaría 8 variantes alélicas (1³⁴, 1³³, 1³², 1³¹, 1²⁸, 1²⁶, 1²⁴, 1²²). Los alelos 1³⁴, 1³³, 1³² se encontraron únicamente en *P. reptans*: 1³¹ estuvo presente en todos los individuos estudiados de *P. kuntzei*. Los alelos 1²⁸, 1²⁶, 1²⁴ y 1²² variaron en frecuencia entre las restantes poblaciones de la sección Algarobia y *P. argentina*. *Idh-2* presentó 4 alelos: 2¹⁷, 2¹², 2¹¹, 2¹⁰. En la mayoría de las poblaciones una variante estuvo fijada con

excepción de *P. kuntzei* y *P. alba* en donde más de un alelo fue encontrado (Figura 2.2 y Apéndice 4 pag. 141).

EST: En la sección Algarobia varios autores (Saidman 1985, Bessega 1997, Julio 2000, Ferreyra 2001) señalaron que ésta sería una enzima monomérica y que presenta patrones enzimáticos complejos. En este estudio se interpretaron un total de 13 loci isoenzimáticos. *Est-1* tendría 4 alelos activos (1^{93} , 1^{92} , 1^{91} , 1^{90}) y los restantes loci presentaron un alelo activo y otro nulo. *Est-1* estuvo presente en todas las especies de Algarobia, resultando variable en todas ellas menos en *P. kuntzei* que presentó un alelo fijado (1^{92}). Este locus estuvo ausente tanto en *P. argentina* como en *P. reptans*. Los loci *Est-2*, *Est-3* y *Est-4* se consideraron ausentes en *P. kuntzei*, *P. argentina* y *P. reptans* ya que en ningún caso presentaron la banda correspondiente al alelo activo. *P. ruscifolia*, *P. alba*, *P. chilensis*, *P. nigra*, *P. flexuosa*, *P. nigra*, *P. glandulosa*, *P. velutina* y *P. vinalillo* presentaron un alelo activo y un alelo nulo en diferentes frecuencias. Los loci *Est-5*, *Est-6*, *Est-7* y *Est-8* sólo mostraron una banda fija en *P. reptans*. Los loci *Est-9*, *Est-10*, *Est-11*, *Est-12* y *Est-13* estuvieron presentes en *P. argentina* con una única variante alélica fijada en ambas poblaciones (Figura 2.2 y Apéndice 4 pag. 142)

AMP: Tomando en cuenta los antecedentes previos para este género (Saidman 1985, Pocoví 1992, Julio 2000, Ferreyra 2001) en este sistema se interpretaron tres genes diferentes (*Amp-1*, *Amp-2* y *Amp-3*). *Amp-1* y *Amp-2* estuvieron presentes en todas las poblaciones y especies pero *Amp-3* sólo estuvo presente en *P. argentina* y *P. reptans*. *Amp-1* presentó una única variante alélica fijada en todas las poblaciones y especies. *Amp-2* fue variable y mostró tres alelos: 2^{88} , 2^{76} y 2^{70} . *P. argentina* y *P. reptans* presentaron

únicamente el alelo 2⁸⁸. *Amp-3* presentó tres alelos en *P. argentina* (3⁷⁷, 3⁷⁵ y 3⁷¹) y sólo las variantes 3⁷⁷ y 3⁷¹ fueron encontradas en *P. reptans* (Figura 2.2 y Apéndice 4 pag. 143).

SOD: Cada banda ha sido interpretada como un loci monomórfico siguiendo la interpretación previa realizada en especies de este género (Saidman 1985, Pocoví 1992, Julio 2000, Ferreyra 2001). Se detectaron un total de 8 loci monomórficos (*Sod-1*, *Sod-2*, *Sod-3*, *Sod-4*, *Sod-5*, *Sod-6*, *Sod-7* y *Sod-8*). De ellos, cinco (*Sod-1*, *Sod-2*, *Sod-3*, *Sod-4*, *Sod-5*) estuvieron presentes en *P. reptans* y en todas las especies de la sección Algarobia estudiadas con excepción de *P. kuntzei*. Esta última especie presentó los loci *Sod-1*, *Sod-3*, *Sod-4* y además *Sod-6*. *P. argentina* presentó algunos loci comunes a las demás especies (*Sod-1*, *Sod-2*, *Sod-3*, *Sod-4*, *Sod-5*) junto a los loci exclusivos *Sod-7* y *Sod-8* (Figura 2.2 y Apéndice 4 pag. 144)

6-PGD: La interpretación hasta el momento de esta enzima en especies de *Prosopis* ha sido dificultosa y se ha propuesto como una enzima dimérica con presencia de alelos nulos (Saidman 1985, Pocoví, 1992, Verga, 1996, Bessega, 1997, Ferreyra, 2001). En el presente trabajo se interpretaron dos loci (6-*pgd-1* y 6-*pgd-2*). 6-*pgd-1* presentaría tres variantes activas y una nula (1³⁰, 1²⁶, 1²³, 1⁰). *P. nigra*, *P. flexuosa*, *P. alba*, *P. ruscifolia*, *P. chilensis* y *P. vinalillo* presentaron variación entre los alelos activos. *P. glandulosa* y *P. velutina* presentaron fijado en todas las poblaciones el alelo 1²⁶. *P. reptans* y *P. kuntzei* solo presentaron el alelo 1³⁰ mientras que *P. argentina* fue variable entre los alelos 1³⁰, 1²⁶ y el alelo nulo (1⁰). El locus 6-*pgd-2* presentó dos alelos activos (2³³, 2²¹) y uno nulo (2⁰). *P. nigra*, *P. flexuosa*, *P. alba*, *P. ruscifolia*, *P. chilensis* y *P. vinalillo* presentaron variación entre los alelos activos. *P. glandulosa* presentó

el alelo activo (2^{33}) y el alelo nulo (2^0) en distinta frecuencia. *P. velutina* y *P. reptans* no presentaron actividad en este locus (2^0). Finalmente, *P. argentina* presentó variación entre el alelo activo (2^{33}) y el alelo nulo (2^0) (Figura 2.2 y Apéndice 4 pag. 145)

PRX: En especies del género *Prosopis* esta enzima se interpretó como monomérica codificada al menos por tres loci (Saidman 1985, Pocoví 1992, Julio 2000, Ferreyra 2001). Al incluir especies de diferentes secciones se interpretaron siete loci (*Prx-1*, *Prx-2*, *Prx-3*, *Prx-4*, *Prx-5*, *Prx-6* y *Prx-7*). *Prx-1*, *Prx-2* y *Prx-3* presentaron una variante activa ($1^{36}, 2^{29}, 3^{21}$) y una nula respectivamente ($1^0, 2^0, 3^0$) y estuvieron presentes en *P. argentina* y en todas las especies de la sección Algarobia estudiadas con excepción de *P. velutina*. Esta última presentó dos genes diferentes fijados con una variante activa (*Prx-6*²⁵, *Prx-7*²²). *P. reptans* presentó dos loci exclusivos cuyas variantes mostraron mayor velocidad de migración (*Prx-4* y *Prx-5*). *Prx-4* presentó un alelo activo fijo (4^{40}) mientras que *Prx-5* presentó dos alelos activos ($5^{39}, 5^{38}$) y uno nulo (5^0) (Figura 2.2 y Apéndice 4 pag. 146).

GOT: Siguiendo estudios previos (Saidman 1985, Pocoví 1992, Verga 1995, Julio 2000, Ferreyra 2001) este sistema isoenzimático se interpretó como una enzima dimérica ya que para cada gen presentó una única banda en los individuos homocigotas y tres en los heterocigotas. Para explicar los patrones obtenidos se describieron 7 genes diferentes (*Got-1*, *Got-2*, *Got-3*, *Got-4*, *Got-5*, *Got-6*, *Got-7*). *Got-1* y *Got-2* estuvieron presentes en todas las especies analizadas difiriendo en los alelos que presentaban y en las frecuencias de los mismos. *P. kuntzei* presentó el alelo $1^{71.5}$ en todos los individuos mientras que *P. reptans* presentó los alelos $1^{68.0}$ y $1^{67.0}$ en forma

variable. Las poblaciones de *P. argentina* presentaron en diferente frecuencia los alelos $1^{69.5}$ y $1^{68.5}$. *P. velutina* presentó en diferentes frecuencias los alelos $1^{72.0}$, $1^{69.0}$ y el alelo $1^{71.0}$ fue exclusivo de esta especie. Las restantes poblaciones variaron en las frecuencias de los alelos $1^{72.0}$, $1^{70.0}$, $1^{69.0}$ y $1^{61.0}$. En *Got-2* se detectaron un total de 9 alelos (2^{27} , 2^{34} , 2^{36} , 2^{37} , 2^{38} , 2^{39} , 2^{40} , 2^{48} , 2^{54}) y las frecuencias variaron en las diferentes poblaciones y especies excepto en *P. velutina* que presentó una única variante alélica fijada (2^{54}). Los loci *Got-3* y *Got-4* fueron encontrados únicamente en *P. velutina* con una banda fija para cada locus. *Got-5* y *Got-6* estuvieron presentes únicamente en *P. kuntzei* presentando el primer locus una única variante alélica fijada (5^{60}) y el segundo dos variantes alélicas activas (6^{25} , 6^{26}) y una nula (6^0). *Got-7* sólo se encontró en *P. reptans* y presentó dos alelos activos (7^{24} y 7^{22}) (Figura 2.2 y Apéndice 4 pag. 147).

La variabilidad genética fue cuantificada a través del porcentaje de loci polimórficos (P), la heterocigosis media (H) y el número medio de alelos por locus (A), (Apéndice 2A pag 127). Las estimas obtenidas para *P. kuntzei*, *P. reptans*, *P. argentina*, *P. glandulosa* y *P. velutina* son presentadas junto a las descriptas para *P. chilensis* (Julio 2000), *P. alba*, *P. ruscifolia*, *P. nigra*, *P. flexuosa* y *P. vinalillo* (Ferreyra 2001) (Tabla 2.5).

Los niveles de variabilidad genética fueron altos y similares en la mayor parte de las poblaciones estudiadas. El número medio de alelos por locus varió entre 1.3 y 2.1 mientras que el P lo hizo entre 17.4% y 66.7%. La heterocigosis media varió entre 0.092 y 0.334. En todos los casos *P. chilensis* (Belén) y *P. reptans* (Herrera) fueron las poblaciones más y menos variables respectivamente.

	N° loci	N	P	H	A
<i>P. kun</i> Tacana	22	48.3 (5.1)	22.7 (7.9)	0.102 (0.041)	1.3 (0.1)
<i>P. arg</i> Tinogasta	28	35.4 (2.3)	28.6 (7.3)	0.097 (0.033)	1.4 (0.1)
<i>P. arg</i> Tucunuco	28	36.4 (2.2)	25.0 (6.7)	0.109 (0.037)	1.4 (0.1)
<i>P. rep</i> Herrera	23	56.0 (3.9)	17.4 (6.2)	0.092 (0.042)	1.3 (0.1)
<i>P. rus</i> Rivadavia	24	53.5 (2.3)	62.5 (9.8)	0.225 (0.047)	1.8 (0.1)
<i>P. rus</i> Herrera	24	63.0 (3.6)	54.2 (10.3)	0.233 (0.048)	1.8 (0.2)
<i>P. rus</i> Sarmiento	24	54.5 (3.2)	58.3 (10.1)	0.226 (0.047)	1.8 (0.1)
<i>P. rus</i> Pinto	24	61.7 (4.9)	62.5 (9.8)	0.234 (0.046)	1.8 (0.2)
<i>P. alb</i> Chicoana	24	39.5 (2.1)	50.0 (10.4)	0.169 (0.043)	1.6 (0.1)
<i>P. alb</i> Trancas	24	38.6 (2.0)	41.7 (10.1)	0.139 (0.038)	1.6 (0.1)
<i>P. alb</i> Sumalao	24	53.9 (2.2)	41.7 (10.1)	0.159 (0.044)	1.7 (0.1)
<i>P. alb</i> LaMerced	24	50.4 (2.8)	37.5 (9.8)	0.159 (0.044)	1.6 (0.1)
<i>P. alb</i> Icaño	24	56.3 (2.8)	50.0 (10.4)	0.198 (0.044)	1.7 (0.1)
<i>P. alb</i> Burruyacú	24	66.0 (4.0)	50.0 (10.4)	0.191 (0.043)	1.7 (0.1)
<i>P. alb</i> Curtiembres	24	74.2 (5.3)	45.8 (10.3)	0.179 (0.042)	1.7 (0.1)
<i>P. chi</i> Patquía	24	47.7 (3.2)	66.7 (9.25)	0.293 (0.047)	1.9 (0.2)
<i>P. chi</i> Belén	24	59.5 (5.3)	66.7 (9.25)	0.334 (0.053)	2.1 (0.2)
<i>P. chi</i> La Higuera	24	50.1 (5.9)	58.3 (10.1)	0.254 (0.048)	1.9 (0.2)
<i>P. chi</i> Talampaya	24	48.9 (3.1)	54.2 (10.3)	0.224 (0.045)	1.8 (0.2)
<i>P. nig</i> Huilla Catina	24	65.5 (3.2)	66.7 (9.2)	0.280 (0.048)	2.1 (0.2)
<i>P. nig</i> La Merced	24	48.2 (2.3)	58.3 (10.1)	0.244 (0.046)	1.8 (0.2)
<i>P. fle</i> LaAmarga	24	68.4 (4.9)	58.3 (10.1)	0.217 (0.046)	1.8 (0.2)
<i>P. fle</i> Quilmes	24	57.0 (3.7)	58.3 (10.1)	0.262 (0.048)	2.0 (0.2)
<i>P. vin</i> 7 de Abril	24	65.4 (4.2)	62.5 (9.8)	0.253 (0.047)	2.0 (0.2)
<i>P. gla</i> Weslaco	23	44.9 (3.7)	55.2 (11.4)	0.218 (0.050)	1.8 (0.2)
<i>P. gla</i> LaCopita	23	33.0 (2.9)	56.5 (10.3)	0.224 (0.050)	1.9 (0.2)
<i>P. gla</i> Bell Co	23	37.7 (2.4)	47.8 (10.4)	0.186 (0.048)	1.8 (0.2)
<i>P. gla</i> Frio Co	23	34.2 (2.6)	56.5 (10.3)	0.212 (0.050)	1.7 (0.2)
<i>P. vel</i> Santa Rita	24	31.2 (2.7)	37.5 (9.8)	0.315 (0.074)	1.5 (0.1)

Tabla 2.5. Variabilidad genética estimada a partir de isoenzimas. N= tamaño promedio de la muestra.

En términos generales las poblaciones pertenecientes a la Sección Algarobia resultan más variables ($\bar{H}$ = 0.220) que las poblaciones de Monilicarpa ($\bar{H}$ = 0.102) y que la única especie de Strombocarpa (H = 0.09). Para probar si los valores de variabilidad genética diferían significativamente entre poblaciones, especies y secciones se realizó un análisis de componentes de varianza (Apéndice 2K pag. 130).

Cuando se analizaron todas las poblaciones de manera conjunta, las mismas mostraron diferencias significativas tanto entre secciones ($p= 1.3 \cdot 10^{-6}$) como entre especies ($p= 7.2 \cdot 10^{-6}$). Las poblaciones pertenecientes a la misma especie no difirieron significativamente en ninguna de las especies aquí estudiadas.

Al comparar las secciones de a pares, Algarobia resultó diferente de Monilicarpa ($p= 0.00032$) y de Strombocarpa ($p= 1.6 \cdot 10^{-5}$). Sin embargo, Monilicarpa y Strombocarpa muestran estimas de H similares ($p= 0.300$).

Dentro de Algarobia, los niveles de variabilidad decrecen en el siguiente orden: *P. velutina* ($\bar{H}=0.315$), *P. chilensis* ($\bar{H}=0.274$), *P. nigra* ($\bar{H}=0.261$), *P. vinalillo* ($\bar{H}=0.253$), *P. flexuosa* ($\bar{H}=0.239$), *P. ruscifolia* ($\bar{H}=0.229$), *P. glandulosa* ($\bar{H}=0.210$), *P. alba* ($\bar{H}=0.171$) y *P. kuntzei* ($\bar{H}=0.102$).

Como al comparar todas las poblaciones de Algarobia de manera conjunta, las diferencias resultan significativas ($p= 2.09 \cdot 10^{-5}$), se estudiaron las diferencias dentro de esta sección excluyendo a las poblaciones de aquellas especies que presentaban los menores valores de variabilidad. Cuando se excluyeron *P. kuntzei* y *P. alba* las diferencias dejaron de ser altamente significativas ($P=0.049$) aunque *P. kuntzei* y *P. alba* mostraron entre sí diferencias significativas ($P=0.0054$).

Dado que *P. kuntzei* y *P. alba* presentaban estimas de H más bajas en relación a las restantes especies de Algarobia, éstas fueron comparadas con *P. argentina* (Monilicarpa) y *P. reptans* (Strombocarpa). Mientras que *P. kuntzei*

no mostró diferencias significativas ($P=0.639$), la heterocigosis media de *P. alba* resultó altamente diferente ($P=0.012$).

El grado de diferenciación genética entre las dos poblaciones de *P. argentina* (Tucunuco y Tinogasta) fue estudiado a través del índice de fijación F_{ST} para los loci variables con alelos codominantes que no presentaron alelos nulos. El valor promedio para todos los loci fue positivo y altamente significativo ($F_{ST} = 0.067$) y el flujo génico estimado (Nm) igual a 3.48 de acuerdo a lo esperado para poblaciones coespecíficas.

IVb. Discusión

Estudios previos en especies de *Algarobia* mostraron una gran dificultad para reconocer las especies a través de marcadores isoenzimáticos (Saidman 1985, Ferreyra 2001) De las especies aquí analizadas sólo *P. velutina* y *P. kuntzei* pueden ser reconocidas fácilmente a través de los zimogramas. Mientras que la primera puede reconocerse a través de los sistemas isoenzimáticos GOT y PRX, *P. kuntzei* se distingue principalmente a través de los sistemas SOD, EST y GOT.

Las especies de las otras dos secciones pueden reconocerse sin dificultad. *P. reptans* (*Strombocarpa*) puede identificarse a través de EST y PRX mientras que las poblaciones de *P. argentina* son reconocidas por medio de los sistemas SOD, EST y GOT (Figura 2.2).

Los niveles de variabilidad genética son en general altos, los valores mayores corresponden a las especies de *Algarobia* y los menores a *P. reptans*

(*Strombocarpa*) y *P. argentina* (Monilicarpa) que no muestran diferencias significativas. Saidman *et al* (1996) señalaron que los niveles de heterocigosis relativamente menores en *Strombocarpa* podrían ser el resultado de un efecto fundador asociado a la colonización y a la ocurrencia de un cierto grado de endogamia.

Los estimas de diferenciación genética mostraron para todas las especies la misma tendencia. En todos los casos se observó un nivel de diferenciación genética altamente significativo y un Nm mayor a un migrante por generación. Sin embargo, en la sección Monilicarpa, la diferenciación genética observada es menor a la presentada por las especies de la sección Algarobia estudiadas, dando lugar a una estima algo mayor de flujo génico entre las poblaciones. Esta tendencia parece apoyar las observaciones de otros investigadores (Villagra com. pers.) que han descrito a *P. argentina* como una especie muy "homogénea" al presentar bajos niveles de variabilidad morfológica y poca plasticidad fenotípica ya que en diferentes condiciones ambientales suele presentar fenotipos muy similares.

V. Sistema De Apareamiento

La estructura poblacional ha sido estudiada en diferentes especies de la Sección Algarobia a través de la electroforesis de isoenzimas por diferentes autores (Saidman 1985, Saidman y Vilardi 1987, Bessega *et al* 2000A, 2000B, Julio 2000, Ferreyra 2001). Allí, las frecuencias genotípicas observadas y esperadas suponiendo equilibrio Hardy-Weinberg, fueron comparadas a través del coeficiente F_{IS} (Wright 1951). Las poblaciones estudiadas de *P. chilensis*, *P. alba*, *P. nigra*, *P. flexuosa*, *P. ruscifolia*, *P. vinalillo*, *P. glandulosa* y *P. velutina*

mostraron una tendencia general al exceso de homocigotas dentro de las poblaciones que se explicó por la ocurrencia de estructuración poblacional y/o cierto grado de endogamia. Sin embargo, estas especies fueron consideradas por mucho tiempo de fecundación cruzada obligada (Burkart 1976, Simpson 1977, Simpson *et al*/1977) y para explicar el exceso de homocigotas observado fue necesario analizar el sistema de apareamiento.

Va. Resultados

Con el objeto de estudiar el sistema de apareamiento que presentan las especies de *Algarobia* se estudió isoenzimáticamente una población de cada una de las siguientes especies: *P. glandulosa* (Weslaco), *P. velutina* (Santa Rita), *P. chilensis* (Patquía), *P. nigra* (Huilla Catina), *P. alba* (Burruyacú), *P. flexuosa* (Quilmes), y *P. ruscifolia* (Rivadavia). Los detalles de colección y ubicación de sitios de muestreo se detallaron en el capítulo 1 pag. 18. Los sistemas enzimáticos ensayados son los mismos que en las secciones anteriores (Apéndice 2D pag. 128) pero para este estudio se utilizaron solamente aquellos loci que pudieron ser ensayados simultáneamente en el mismo individuo. Aquí, los individuos fueron analizados por "familias" formadas por todas las semillas coleccionadas de una misma planta madre. Al menos 10 semillas fueron analizadas por cada planta madre, de modo que se estudiaron 10 familias en las poblaciones argentinas y 5 en las Norteamericanas. Las familias consistían en hermanos o medio hermanos según la procedencia del polen que haya fertilizado cada óvulo de la planta madre. Una vez conocidos los genotipos de los hijos de una planta madre (semillas), fue posible deducir el genotipo de las madres utilizando el método de Brown & Allard (1970).

Se estimaron parámetros del sistema de apareamiento tales como la tasa de exogamia (o fecundación cruzada) multilocus (tm), la tasa de exogamia para loci individuales (ts), la correlación de estas tasas dentro de los grupos fraternos (rt), la correlación de paternidad por exocruza (rp) y los índices de fijación para la población de plantas madres (F_{ISM}) y para la población de hijos (F_{ISO}) (Apéndice 2B y 2C pag. 127).

Las estimas de las tasas de fecundación cruzada no variaron significativamente cuando se calcularon a partir de un único locus (ts) o varios simultáneamente (tm) (Test de student $T_6=0.98$ $P=0.36$). tm varió entre 0.72 en *P. alba* y 1 en *P. nigra* indicando que las especies presentan en la mayoría de los casos fecundación cruzada pero que hasta un 28% de autofecundación puede ocurrir. Un promedio del 15% de autofecundación ocurriría en todas las especies aquí estudiadas.

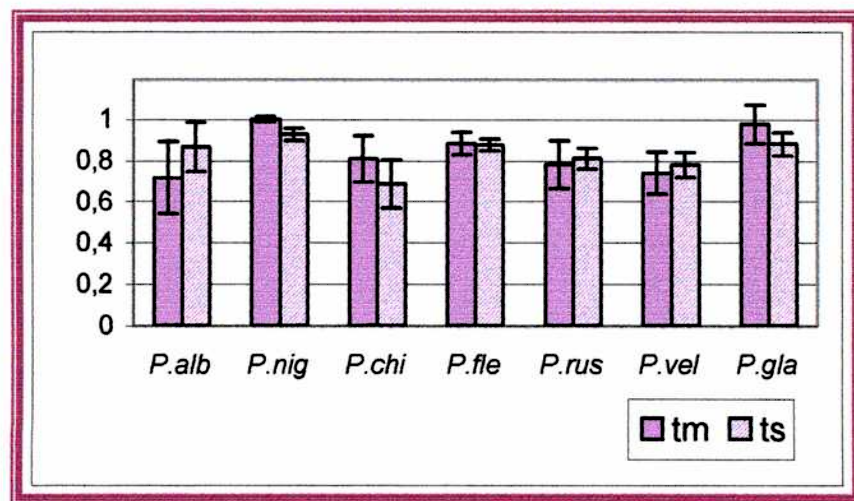


Figura 2.3. tm y ts correspondientes a las siete especies estudiadas.

La correlación de tm dentro de los grupos fraternos (rt) varió entre 0.398 en *P. chilensis* y 0.942 en *P. flexuosa*. En general, en la mayoría de las especies, los valores fueron altos indicando que las tasas varían entre los

árboles dentro de las poblaciones. Las correlaciones de paternidad por exocruza (rp) variaron entre 0.620 en *P. nigra* y 0.990 en *P. flexuosa*, *P. ruscifolia*, *P. velutina* y *P. glandulosa*. Los altos valores de rp indicaron que la mayoría de los individuos analizados (semillas) dentro de cada familia eran hermanos completos y no medio hermanos.

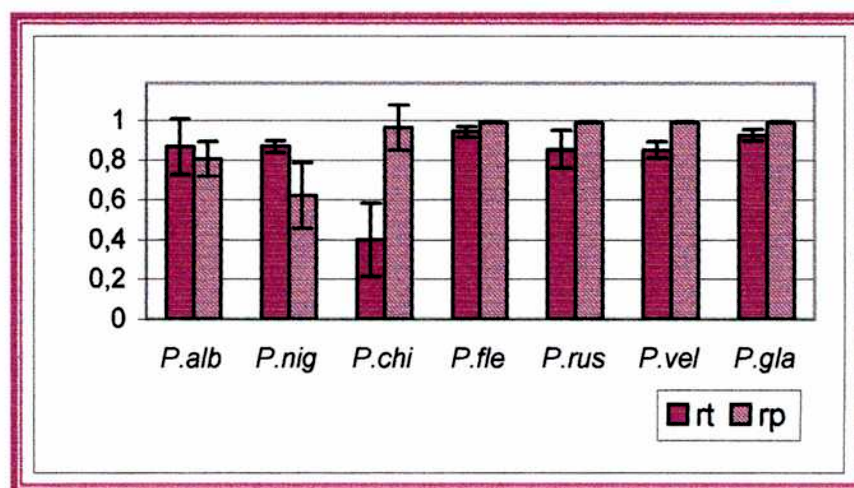


Figura 2.4. rt y rp correspondientes a las siete especies estudiadas.

Las estimas de coeficiente de endogamia calculadas a partir de los genotipos de las plantas madres (F_{ISM}) y en la población hija (F_{ISO}) fueron en todos los casos mayores o iguales a cero (Tabla 2.6). Los valores de F_{ISO} resultaron siempre significativamente mayores (Test de Student T= 7.87, P= 0.0002) que los valores de F_{ISM} .

	F_{ISO}	F_{ISM}
<i>P. alba</i> Burruyacú	0.242 (0.161)	0.008 (0.001)
<i>P. nigra</i> Huilla Catina	0.175 (0.086)	0.000 (0.000)
<i>P. chilensis</i> Patquía	0.391 (0.139)	0.225 (0.116)
<i>P. flexuosa</i> Quilmes	0.295 (0.085)	0.000 (0.000)
<i>P. ruscifolia</i> Rivadavia	0.389 (0.107)	0.022 (0.003)
<i>P. velutina</i> Santa Rita	0.312 (0.175)	0.098 (0.032)
<i>P. glandulosa</i> Weslaco	0.383 (0.103)	0.022 (0.000)

Tabla 2.6. F_{IS} estimados a partir de los genotipos de las semillas hijas (F_{ISO}) y de los genotipos maternos (F_{ISM}).

Las frecuencias alélicas observadas en polen y óvulo fueron comparadas por medio de tablas de contingencia. De las 44 comparaciones realizadas sólo 8 (en negrita en la Tabla 2.7) dieron diferencias significativas sugiriendo baja heterogeneidad entre las frecuencias de las mismas.

		<i>P. alba</i>		<i>P. nigra</i>		<i>P. chilensis</i>		<i>P. flexuosa</i>		<i>P. ruscifolia</i>		<i>P. velutina</i>		<i>P. glandulosa</i>	
		P	O	P	O	P	O	P	O	P	O	P	O	P	O
<i>Amp-2</i>	2 ⁸⁸	—	—	—	—	—	—	0.45	0.40	—	—	0.79	0.87	0.43	0.40
	2 ⁷⁶	—	—	—	—	—	—	0.54	0.60	—	—	0.21	0.13	0.43	0.50
	2 ⁷⁰	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.14	0.10
<i>Est-1</i>	1 ⁹³	0.02	0.06	0.30	0.28	—	—	0.01	0.04	0.03	0.05	0.13	0.11	0.07	0.10
	1 ⁹²	0.94	0.78	0.51	0.61	—	—	0.85	0.73	0.86	0.90	0.69	0.78	0.52	0.50
	1 ⁹¹	0.04	0.17	0.18	0.11	—	—	0.13	0.18	0.11	0.05	0.18	0.11	0.42	0.40
	1 ⁹⁰	—	—	—	—	—	—	0.01	0.04	—	—	—	—	—	—
<i>Got-1</i>	1 ⁷²	0.05	0.05	0.01	0.05	—	—	0.56	0.50	0.06	0.10	0.03	0.30	0.17	0.08
	1 ⁶⁹	0.94	0.95	0.62	0.53	—	—	0.44	0.50	0.94	0.90	0.21	0.10	0.22	0.30
	1 ⁶¹	—	—	0.37	0.42	—	—	—	—	—	—	0.03	0.10	0.01	0.08
	1 ⁷¹	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.73	0.50	0.01	0.08
	1 ⁷⁰	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.59	0.46
<i>Got-2</i>	2 ⁴⁸	0.09	0.05	0.33	0.17	—	—	0.20	0.40	0.45	0.81	0.03	0.08	0.61	0.70
	2 ⁴⁰	0.91	0.95	0.65	0.78	—	—	0.65	0.55	0.52	0.14	0.03	0.08	0.39	0.30
	2 ³⁴	—	—	0.01	0.06	—	—	0.15	0.05	0.03	0.05	0.03	0.08	—	—
	2 ²⁷	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.03	0.08	—	—
	2 ⁵⁴	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.88	0.68	—	—
<i>Idh-1</i>	1 ¹⁰⁰	—	—	—	—	0.30	0.43	0.01	0.05	—	—	0.47	0.11	0.06	0.09
	1 ⁷⁰	—	—	—	—	0.66	0.50	0.19	0.09	—	—	0.53	0.89	0.89	0.82
	1 ⁶³	—	—	—	—	0.04	0.07	0.78	0.81	—	—	—	—	0.05	0.09
	1 ⁶⁰	—	—	—	—	—	—	0.01	0.05	—	—	—	—	—	—
<i>Idh-2</i>	2 ⁴³	—	—	—	—	0.04	0.07	0.99	0.95	—	—	0.03	0.11	0.02	0.09
	2 ²⁶	—	—	—	—	0.67	0.47	0.01	0.05	—	—	0.97	0.89	0.98	0.91
	2 ³⁰	—	—	—	—	0.29	0.47	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>6pgd-1</i>	1 ²⁶	—	—	—	—	0.23	0.67	0.6	0.45	—	—	0.04	0.11	0.02	0.09
	1 ³⁰	—	—	—	—	0.24	0.27	0.35	0.55	—	—	0.96	0.89	0.98	0.91
	1 ⁰	—	—	—	—	0.53	0.07	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>6pgd-2</i>	2 ²¹	—	—	—	—	0.80	0.71	0.29	0.35	—	—	0.04	0.10	0.02	0.08
	2 ²³	—	—	—	—	0.10	0.07	0.09	0.15	—	—	0.04	0.10	0.02	0.08
	2 ⁰	—	—	—	—	0.10	0.21	0.62	0.50	—	—	0.92	0.80	0.96	0.84
<i>Skd-1</i>	1 ²⁴	0.23	0.06	0.36	0.06	0.12	0.87	0.57	0.60	0.03	0.10	0.67	0.63	0.19	0.09
	1 ²²	0.58	0.61	0.46	0.67	0.57	0.06	0.24	0.15	0.97	0.90	0.33	0.37	0.49	0.64
	1 ¹⁹	0.19	0.33	0.18	0.28	0.31	0.06	0.19	0.25	—	—	—	—	0.32	0.27

Tabla 2.7. Frecuencias alélicas para polen y óvulo para cada especie estudiada.

Vb. Discusión

Los valores de t_m y t_s obtenidos señalan que las especies estudiadas no presentan fecundación cruzada obligada sino que cierto grado de endogamia puede ocurrir. De acuerdo con esto, los valores de F_{IS} encontrados en las especies de la Sección Algarobia podrían ser explicados por ocurrencia de autofecundación además de por estructuración poblacional.

La diferencia entre los valores de F_{IS} entre las plantas madres y la generación hija señala que en los adultos el exceso de homocigotas no sería tan importante como el que se observa en las semillas. Esto podría deberse a fuerzas selectivas diferenciales a favor de las semillas heterocigotas reduciendo la proporción de individuos autofecundados en la población adulta.

Si tomamos en cuenta las tasas de fecundación cruzadas obtenidas y los valores de correlación r_p y r_t se puede concluir que los individuos de la progenie estudiada son hermanos y no medio hermanos (es decir que comparten el mismo padre además de la madre). Esto podría ser explicado por la ocurrencia de autofecundación parcial y por la dispersión limitada del polen que favorece el cruzamiento entre vecinos, dando como resultado una gran estructura familiar. La idea de dispersión limitada de polen es compatible con la falta de diferenciación entre las frecuencias de polen y de óvulo observada.

Cuando ocurre cierto grado de autofecundación y la dispersión del polen es limitada como en este caso, uno debe esperar que las poblaciones naturales aumenten su nivel de endogamia en condiciones naturales. Si a este hecho le sumamos que la dispersión de las semillas también es limitada, ya que es por vía

endozoica el nivel de endogamia esperado es aún mayor. Esto dificulta la comprensión del nivel de variabilidad genética tan alto observado en las poblaciones de la sección *Algarobia* estudiadas hasta el momento y los bajos niveles de diferenciación genética observados entre las poblaciones coespecíficas.

Las poblaciones pertenecientes a las especies *P. ruscifolia*, *P. nigra*, *P. glandulosa*, *P. velutina*, *P. nigra*, *P. alba* y *P. flexuosa* incluidas en el presente trabajo muestran en general una misma tendencia y las tasas de autofecundación estimadas son similares a las previamente descritas para tres poblaciones de *P. velutina* (Keys y Smith 1994). Un mayor número de especies de *Algarobia* deberían ser estudiadas a fin de poder analizar si la misma tendencia se mantiene en las restantes especies de la sección.

Capítulo 3

Relaciones Filogenéticas: Métodos De Distancia Y Parsimonia.

I. Introducción

a. Relaciones Filogenéticas

b. *Prosopis*

II. Resultados y Discusión

a. Isoenzimas

b. RFLP

c. Secuenciación Del Intergén *TrnT-TrnD* (cpDNA)

d. Secuenciación De Los Espaciadores Internos Transcritos del ADNr (ITS-1 e ITS-2)

e. Congruencia Entre Arboles

I. Introducción

Ia. Relaciones Filogenéticas

Las metodologías tradicionales tales como la morfología, anatomía, fisiología o paleontología resultan muy útiles para realizar estudios evolutivos. Así, las diferentes aproximaciones suelen proveer datos que resultan complementarios. Las características morfológicas y anatómicas son necesarias para estudios taxonómicos y la información paleontológica es fundamental para reconstruir el marco en los estudios evolutivos.

En los últimos años, nuevas metodologías han comenzado a aplicarse para estudiar las relaciones evolutivas entre organismos. Estas se basan en la utilización de marcadores moleculares y son referidas como relaciones filogenéticas. El uso de datos moleculares para realizar filogenias comenzó alrededor de los años 60. Los datos de secuencias de proteínas permitieron por primera vez dilucidar las relaciones entre los órdenes de los mamíferos y de taxa aún más distantes (Fitch y Margoliash 1967). Estos datos permitieron resolver interrogantes a diferentes niveles taxonómicos, los mismos fueron útiles en estudios de poblaciones o especies cercanas (Templeton 1992), en eventos evolutivos muy antiguos tal como el origen de las mitocondrias y cloroplastos (Cedergren *et al*/1988, Giovannovi *et al*/1988, Lockhart *et al*/1994) y al definir la divergencia entre phyla y reinos (Sogin *et al*/1986, Woese 1990).

Los datos moleculares y bioquímicos resultan herramientas muy útiles junto con los datos morfológicos y fisiológicos. Sin embargo, los datos moleculares poseen características que les confieren ciertas ventajas frente a los otros, razón por la cual están siendo ampliamente utilizados. Las secuencias

de ADN y de proteínas evolucionan de un modo más constante que los caracteres morfológicos y fisiológicos por lo que pueden brindar una idea más clara de las relaciones entre los organismos. Además, los datos de este tipo son muy abundantes y se han desarrollado un gran número de algoritmos matemáticos para ellos (Nei 1987, Felsenstein 1988, Swofford y Olsen 1990).

Independientemente de la fuente de datos que se analice, se pueden distinguir dos esquemas de clasificación dado que es posible analizar las relaciones entre especies desde diferentes aspectos. Uno, basado en el agrupamiento de los taxa de acuerdo a la similitud presente entre ellos y otro basado en el agrupamiento de acuerdo a la secuencia histórica de los eventos de divergencia.

Los seguidores del primer esquema de clasificación suelen ser llamados "feneticistas". Ellos estudian las relaciones de los grupos de organismos en base al grado de similitud fenotípica, anatómica, molecular, etc. Los seguidores de esta escuela suelen utilizar medidas de distancia para reconstruir las relaciones entre los taxa. Los seguidores del segundo esquema de clasificación suelen ser referidos como "cladistas" y establecen las relaciones genealógicas entre los taxa. Los seguidores de esta escuela han definido un método de inferencia de relaciones basado en la presencia de caracteres derivados compartidos.

Árboles Filogenéticos- Todos los organismos están relacionados entre sí por descendencia y los organismos más cercanamente relacionados descienden de un antecesor común más reciente que los organismos más distantes. Los estudios filogenéticos intentan reconstruir la genealogía

correcta entre los organismos y en algunos casos, estimar el tiempo de divergencia entre los mismos desde el último antecesor común.

Las relaciones evolutivas entre un grupo de organismos suelen ser ilustradas en un árbol filogenético. Este es un gráfico compuesto por nodos y ramas en donde los nodos internos representan a las unidades ancestrales y los externos a las unidades taxonómicas operativas u OTUs (especies, poblaciones, individuos, genes, etc.). El patrón de ramificación del árbol suele ser llamado topología y las ramas definen las relaciones entre las OTUs en términos de descendencia y ancestralidad o simplemente relaciones de similitud. Además, es posible representar el número de cambios que ha ocurrido entre los taxa en la topología del árbol a través de diferencias en el largo de las ramas.

En general los árboles que se obtienen suelen ser no enraizados, pero pueden transformarse en enraizados utilizando un grupo externo o "outgroup", el cual está representado por una OTU que por información adicional (taxonomía, paleontología, etc.) es posible establecer que se diferenció con anterioridad respecto al grupo en estudio.

Los árboles pueden ser aditivos y/o ultramétricos. Los árboles aditivos contienen información acerca del largo de las ramas, es decir que cada rama tiene un valor asociado que corresponde a la cantidad de cambio evolutivo ocurrido. Un árbol es aditivo cuando las distancias entre dos OTUs cualquiera es equivalente a la suma del largo de todas las ramas que las conectan. Los árboles ultramétricos son un caso particular de árboles aditivos en los que los taxones terminales están equidistantes de la raíz del árbol. En este último tipo

de árbol el largo de las ramas puede brindar información acerca del grado de separación entre nodos ó el tiempo de divergencia entre linajes dado que las tasas de evolución se consideran similares entre las mismas.

Los árboles obtenidos en base a la similitud entre taxa son llamados "fenogramas" y los obtenidos en base a la historia evolutiva de los mismos "cladogramas". Un fenograma puede servir como un indicador de las relaciones cladísticas, pero no siempre los árboles son iguales. Cuando existe una relación lineal entre el tiempo de divergencia y el grado de diferenciación genética (o morfológica) los mismos resultarán idénticos.

Arbol Verdadero, Arbol De Las Especies, Arbol Del Gen- Existe un sólo árbol que representa la verdadera historia evolutiva para un número determinado de OTUs pues la forma en que ocurrieron los eventos de especiación en un grupo es única. A partir de un "set" de datos es posible inferir un árbol, pero el mismo puede no ser idéntico al árbol verdadero.

Un árbol filogenético que representa el orden de especiación de un grupo de especies se denomina "árbol de especies" y cuando se construye un árbol a partir de un gen, lo que se obtiene es el "árbol del gen". Este último puede corresponder o no con el árbol de las especies. A fin de obtener una buena reconstrucción del árbol de las especies es necesario incluir la mayor cantidad de información posible como datos de diversas fuentes y un alto número de caracteres.

Métodos De Reconstrucción De Arboles- Existen varios métodos (Sneath y Sokal 1973, Nei 1987, Felsenstein 1988) que han sido propuestos

para reconstruir la filogenia de un grupo. Estos pueden ser clasificados en tres tipos: de matrices de distancia, de máxima parsimonia y de máxima verosimilitud.

En los métodos de matrices de distancia se calculan las distancias evolutivas para todos los pares de taxa y se reconstruye el árbol filogenético utilizando un algoritmo basado en las relaciones entre dichos valores. Dentro de este tipo de métodos, el más simple es el método de medias no ponderadas (UPGMA) y fue desarrollado para construir fenogramas taxonómicos, es decir, árboles que mostraban el parecido entre OTUs (Sokal y Michener 1958). Este algoritmo puede ser utilizado para reconstruir árboles filogenéticos cuando las tasas de evolución son aproximadamente constantes entre los diferentes linajes, es decir, cuando existe una relación lineal entre la distancia evolutiva y el tiempo de divergencia (Nei 1975). Este método emplea un algoritmo de agrupamiento secuencial en el que las relaciones topológicas son inferidas en orden de disimilitud decreciente y el árbol va siendo construido agregando las OTUs de a una por vez dando lugar a un árbol ultramétrico (ver Li 1997 pag. 106).

Otro método basado en las matrices de distancias es el Neighbor-Joining (NJ) (Saitou y Nei 1987). Este método se basa en encontrar los taxa vecinos secuencialmente de modo que se minimice el largo total del árbol dando lugar a un árbol aditivo. Este algoritmo parte de un árbol en forma de estrella donde ninguna OTU está asociada, selecciona aquellas dos OTUs (cualesquiera) que impliquen la menor suma de largo de ramas. Luego este par de OTUs es considerado como una sola OTU y una nueva asociación se forma.

De modo sucesivo se van adicionando las restantes OTUs hasta obtener la topología final del árbol (ver Li 1997 pag. 111).

El segundo tipo de método de reconstrucción filogenética es el método de máxima parsimonia (MP). Aquí, en lugar de construir el árbol a partir de las distancias genéticas se utilizan los estados de los caracteres. El principio de MP busca el árbol que requiera el menor número de cambios evolutivos para explicar las diferencias observadas entre las OTUs que se estudian. Pueden obtenerse mas de un árbol que posean el mismo número de cambios, es decir que mas de un árbol puede inferirse a partir de un mismo "set" de datos. El método para datos moleculares fue diseñado en primer lugar para datos de secuencias de aminoácidos (Eck y DayHoff 1966) y luego fue modificado para secuencias nucleotídicas (Fitch 1977). El procedimiento para inferir el árbol a través de este método requiere: primero, identificar los sitios informativos es decir, las homologías derivadas compartidas por dos o más taxa de un mismo grupo (sinapomorfías). Luego, en cada árbol posible, se infiere el número mínimo de sustituciones para cada uno de los sitios informativos. Posteriormente se suma en cada árbol los números de pasos calculados (suma total) y finalmente se elige él o los árboles con el menor número de sustituciones totales (ver Li 1997 pag. 112).

El tercer método de reconstrucción, método de máxima verosimilitud (ML), es el menos utilizado en la actualidad. Este método fue desarrollado por Cavalli-Sforza y Eduards (1967) quienes utilizaron datos de frecuencias génicas. Más tarde, Felsenstein (1973, 1981) desarrolló algoritmos de ML para secuencias de proteínas y de ADN. El principio de este algoritmo sostiene que si la información relativa de los procesos evolutivos es incluida en el análisis,

las estimas de la filogenia que se obtengan resultarán mas confiables. En estos casos se supone que los cambios evolutivos son puramente un proceso aleatorio y como resultado cada filogenia posible para un conjunto de taxones debe tener una cierta probabilidad de ser correcta dado un conjunto particular de datos. Entonces, el árbol preferido resulta aquel que con mayor probabilidad haya dado lugar al conjunto particular de datos (ver Li 1997 pag. 116)

Elección Del Método De Reconstrucción Filogenética- No todos los métodos de reconstrucción filogenética son aplicables en todas las circunstancias. Dependiendo del tipo de datos disponibles y del número de taxones analizados alguno de ellos puede resultar mejor que otro. Para elegir el modo de reconstrucción mas adecuado es necesario considerar el tipo de árbol que se obtiene y la información que brindan, el tipo de datos que consideran, los supuestos inherentes de cada modelo, los tiempos computacionales, etc.

Como se describió anteriormente, los árboles basados en distancias y los cladogramas brindan diferente tipo de información. El método de MP representa típicamente a la escuela cladística mientras que el UPGMA es típico de la escuela feneticista. Sin embargo, los otros métodos descriptos, no pueden ser clasificados tan fácilmente. Por ejemplo, se ha dicho por muchos años que el NJ es un algoritmo fenético pero algunos autores lo discuten. Si bien utiliza medidas de distancias genéticas, no asume una correlación directa entre la similitud y las relaciones evolutivas (Ver Li 1997 pag. 126).

Los diferentes métodos de reconstrucción también varían en los datos que consideran. Por mucho tiempo ha sido argumentado que tomar los datos

según el estado del carácter resulta mas informativo que considerar distancias genéticas, porque al transformar toda los datos en una única medida de distancia cierta información puede perderse. Si bien ésto es cierto, el método MP dispone de todos los datos y sólo utiliza una pequeña fracción de ellos. Este es el motivo por el que se requiere un alto número de caracteres para que la reconstrucción se pueda realizar eficientemente. El método de ML, por su parte utiliza todos los caracteres disponibles.

Los supuestos inherentes de cada método les confieren en algunos casos ventaja frente a los otros. Así, a diferencia del NJ, el método UPGMA asume tasas constantes de evolución para todas las ramas. El método de MP no tiene supuestos explícitos, salvo el principio del modelo que asume que el mejor árbol es aquel con menor número de sustituciones. Aquél árbol que minimiza el número de sustituciones también minimiza el número de eventos homoplásicos, es decir paralelismos, convergencias y sustituciones reversas. El método de MP ha demostrado ser muy bueno para realizar reconstrucciones cuando el grado de divergencia entre secuencias es bajo y las homoplasias son raras. Por el contrario cuando la divergencia entre secuencias es alta y el número de homoplasias es mayor, el método no resulta tan bueno. El método de ML tiene supuestos explícitos acerca de la tasa de evolución y el patrón de sustitución nucleotídica. La necesidad de suponer *a priori* un modelo evolutivo ha llevado a algunos autores a sugerir que este método no sería muy robusto (Tateno *et al* 1994) y se ha discutido la necesidad de presuponer parámetros detallados del mecanismo con el que la evolución opera para estudiar justamente, la evolución de un grupo (Farris 1983, Goloboff 1998).

Con respecto a los tiempos computacionales, en los métodos de matrices de distancias, las OTUs son agrupadas de modo secuencial para dar el árbol derivado. Por esta razón estos algoritmos suelen funcionar rápidamente. En comparación el método de máxima parsimonia (MP) toma en cuenta todas las alternativas posibles de árboles y resulta algo mas lento. El método de máxima verosimilitud (ML) es el algoritmo que utiliza mas tiempo al buscar todas las topologías y calcular el valor de verosimilitud para cada una de ellas. Aunque los métodos varían en el tiempo computacional que requieren para realizar la reconstrucción filogenética, el mismo está directamente relacionado con el número de taxones incluidos y la cantidad de caracteres estudiados.

Estimación Del Error De Muestreo: Bootstrap- Una forma de estimar el error de muestreo es tomar múltiples muestras de la población que está siendo estudiada y comparar las estimas obtenidas en las diferentes muestras. La distribución de dichas estimas brindará una idea del error de muestreo, es decir, que proporción de nuestras conclusiones variará dependiendo de la muestra que hemos tomado. Dado que realizar muestreos repetidos es en muchos casos muy costoso y laborioso, es bueno disponer una forma de estimar el error de muestreo sin necesidad de obtener muestras múltiples. Para la mayor parte de las distribuciones sencillas (por ejemplo la distribución normal) existen ecuaciones simples para calcular los intervalos de confianza alrededor de una estima (por ejemplo, el error estándar de la media). Sin embargo, aunque los árboles son estructuras complicadas y es muy difícil desarrollar ecuaciones para estimar intervalos de confianza alrededor de una filogenia, en los últimos años, algunos métodos computacionales han sido desarrollados para estimarlos. El método de remuestreo conocido como "bootstrap" es el más utilizado en los estudios filogenéticos. Esta metodología

ha sido introducida en este tipo de estudios por Felsenstein (1985) y se utiliza frecuentemente para estimar el nivel de confianza de las hipótesis filogenéticas.

El "bootstrapping" imita el método de estimación de error de muestreo pero en lugar de muestrear la población en estudio, se remuestrea la propia muestra. Cada vez que se toma una muestra se obtiene una pseudoréplica y de cada una de ellas se estima el parámetro que se intenta medir (árbol filogenético). La variación entre las estimas obtenidas en cada una de las pseudoréplicas es una medida del error de muestreo asociada al parámetro de interés.

El "bootstrap" puede ser aplicado en estudios filogenéticos al generar pseudoréplicas de los datos de secuencia o de frecuencias alélicas. Se toma el "set" de datos original y por muestreo aleatorio y con reemplazo de los datos originales se obtiene un nuevo "set" de datos (pseudoréplica) con el mismo número de caracteres. Dado que el método implica reemplazo, en las diferentes pseudoréplicas un mismo carácter puede aparecer mas de una vez mientras que otros están ausentes. Este proceso se repite un gran número de veces (aproximadamente 100) y a partir de cada una de las diferentes réplicas se reconstruyen los árboles utilizando cualquiera de los métodos anteriormente descritos. El "set" de árboles resultante contiene la información acerca del error asociado con nuestra muestra.

Incongruencia Filogenética- Las reconstrucciones filogenéticas deben ser basadas en múltiples caracteres moleculares a fin de poder reconstruir la

historia del grupo y no simplemente la historia de los genes (Jansen *et al* 1998).

Una de las consecuencias de analizar múltiples datos es que las filogenias que se infieren de cada tipo de datos pueden diferir entre sí en uno o varios puntos. La incongruencia filogenética no es rara; por el contrario, parece ser mas la regla que la excepción (Wendel y Doyle 1998). Como los distintos "set" de datos pueden tener diferentes historias evolutivas, se espera en ese caso que resulten en diferentes reconstrucciones de los taxa en estudio.

No todos los casos de incongruencia tienen la misma magnitud. Dependiendo de las causas que las provocan podremos decir si la misma es real o no. Las causas que provocan incongruencia filogenética pueden dividirse en dos grupos: las causas técnicas y las de procesos, siendo las primeras menos importantes desde el punto de vista biológico. En este caso los clados están débilmente soportados y las diferentes reconstrucciones difieren en unos pocos pasos. Puede suceder que los datos no sean suficientes, que la región del genoma elegida no sea la correcta, que la calidad de las secuencias no sea buena, que se haya muestreado un bajo número de taxones, o que éstos no hayan sido correctamente identificados.

Los casos más interesantes que provocan incongruencia entre filogenias no son los resultantes de causas técnicas sino aquellos que reflejan diferentes historias evolutivas de los datos. Varios fenómenos tales como las diferentes tasa de evolución entre los caracteres, la rápida diversificación, la hibridación y la introgresión, la clasificación en linajes de los diferentes polimorfismos

("lineaje sorting" LS) y la transferencia horizontal pueden producir árboles de genes que no son equivalentes a los árboles de las especies (Wendel y Doyle 1998).

Ib. Prosopis

Tal como se describió en el primer capítulo, las especies de *Prosopis* son muy variables desde el punto de vista morfológico (Burkart 1976). Las relaciones sistemáticas y evolutivas en algunas especies de la Sección Algarobia se ven opacadas por los frecuentes eventos de hibridación interespecífica que ocurren en la naturaleza y que dan lugar a híbridos fértiles en áreas de simpatría (Palacios y Bravo 1981, Hunziker *et al*/1986). En nuestro país, en la Región Biogeográfica Chaqueña, la hibridación involucra especies pertenecientes a la misma o a diferentes series. Como los híbridos son fértiles y los mecanismos de aislamiento entre las especies parecen ser débiles, estas especies fueron consideradas integrantes de un singameón (Palacios y Bravo 1981, Saidman 1985, Saidman y Vilardi 1987, 1993). Aunque años mas tarde varios autores han sugerido (Montoya *et al* 1994, Burghardt 1995A, 1995B, Ferreyra 2001) que las mismas serían especies cohesivas (Templeton 1989).

Resultados previos señalaron que la diferenciación genética encontrada a través de marcadores bioquímicos y genéticos dentro de este grupo es muy baja y las asociaciones basadas en el nivel de similitud entre las especies no se ajustan a las series descriptas en base a la morfología (Saidman 1985, Saidman y Vilardi 1987, 1993). Los factores que promueven la alta similitud genética observada no se comprenden totalmente. Así, las evidencias disponibles hasta el presente son compatibles con la hipótesis de que la alta

similitud genética es una consecuencia de la hibridación e introgresión (Saidman 1985, Saidman y Vilardi 1987, 1993). Sin embargo, estudios previos (Bessega *et al* 2000B) también señalaron que las especies son capaces de mantener las frecuencias alélicas dentro de un estrecho rango de variación; esta habilidad puede ser relacionada también con factores adicionales independientes de la hibridación tales como tiempos de divergencia cortos, poblaciones con grandes tamaños efectivos que reducen los efectos de la deriva génica, o selección sobre los marcadores estudiados.

Una forma de evaluar la importancia relativa de la hibridación en este grupo es a través de la comparación del nivel de similitud genética entre especies simpátricas y alopátricas. De hecho, si la similitud genética se debe a la hibridación, se espera que las especies simpátricas de esta sección con oportunidad para hibridar muestren niveles de diferenciación genética menores que las especies alopátricas. Otra forma de analizar la importancia de este proceso es a través del estudio de especies simpátricas con y sin evidencias de hibridación. Si la similitud genética se debe a hibridación, se espera que las especies incapaces de hibridar muestren una diferenciación genética más alta que las especies que lo hacen naturalmente.

Sin embargo, también puede ocurrir que el nivel de diferenciación genética esté más relacionado con el orden en que divergieron las especies y no con la oportunidad de hibridar que ellas presentan. Una forma de analizar este factor es a través del estudio de las relaciones de ancestralidad-descendencia. El estudio conjunto del nivel de diferenciación genética y el orden de divergencia incluyendo tanto especies simpátricas y alopátricas como especies que muestren y no muestren evidencias de hibridación, brindará

información para explicar el nivel de similitud genética encontrado entre ellas y permitirá aportar datos acerca del proceso de especiación.

De acuerdo con estos antecedentes el objetivo del presente capítulo fue:

- Estudiar las relaciones filogenéticas entre especies pertenecientes a las Secciones Algarobia, Monilicarpa y Strombocarpa utilizando datos isoenzimáticos, patrones de restricción de ADN de cloroplasto (RFLP) y secuencias de la región intergénica de cpDNA *TrnT-TrnD* y de los espaciadores internos transcritos del ADN ribosómico nuclear 18S-26S (ITS-1 e ITS-2).

Para ello, se incluyeron diferentes especies de Algarobia con evidencias de hibridación, una especie que hasta el presente no se han descrito híbridos interespecíficos (*P. kuntzei*), dos especies norteamericanas (*P. glandulosa* y *P. velutina*) que por la distribución geográfica tienen escasa o ninguna capacidad de hibridar con las especies Sudamericanas. Además, se estudió la única especie de la Sección Monilicarpa (*P. argentina*) y una especie representante de la Sección Strombocarpa (*P. reptans*).

II. Resultados y Discusión

IIa. Isoenzimas

A partir de los resultados isoenzimáticos presentados en el capítulo anterior se realizó un análisis fenético incluyendo 29 poblaciones representando a las secciones: Monilicarpa, Strombocarpa y Algarobia (Ver tabla 1.1 pag. 17 primera fila). En este análisis se reconstruyeron las relaciones

entre las poblaciones a partir de la matriz de distancias genéticas (Nei 1972) (Apéndice 2L pag. 130). En las Figuras 3.1 y 3.2 se presentan los fenogramas obtenidos utilizando el algoritmo de agrupamiento UPGMA (árbol ultramétrico) y el método de Neighbor-Joining (NJ) (árbol aditivo). El nivel de confianza de las ramas fue medido por medio del método de "bootstrap" (Felsenstein 1985) utilizando el sub-programa seqboot del paquete PHYLIP 3.5 (Felsenstein, 1993) y se representan sobre los nodos de ambas figuras.

En términos generales los resultados obtenidos utilizando ambos algoritmos (UPGMA y NJ) fueron similares. En la mayor parte de los casos los valores de bootstrap señalaron grupos altamente consistentes y las especies pertenecientes a las diferentes secciones estudiadas fueron diferenciadas genéticamente.

En la Figura 3.1 (pag. 79) tanto *P. argentina* (Monilicarpa) como *P. reptans* (Strombocarpa) presentaron una distancia genética alta respecto a las restantes especies de Algarobia (0.52 y 0.48 respectivamente). Prácticamente el mismo nivel de diferenciación se encontró entre cualquiera de éstas especies y las de la Sección Algarobia. Las poblaciones estudiadas de *P. argentina* fueron muy similares entre sí presentando un valor de distancia genética muy bajo (0.012) y similar al presentado entre las poblaciones de *P. ruscifolia*, *P. glandulosa* y *P. alba*.

Dentro de la Sección Algarobia, las poblaciones coespecíficas resultan agrupadas entre sí en la mayoría de los casos. Las especies no resultaron asociadas según las series morfológicas y el nivel de diferenciación entre especies fue bajo. Todas las poblaciones de las especies pertenecientes a las

Series Chilenses y Ruscifoliae estudiadas presentaron bajos niveles de diferenciación genética (0.005 - 0.23) en concordancia con la falta de marcadores específicos isoenzimáticos. *P. glandulosa* y *P. ruscifolia* formaron un grupo junto a *P. nigra*. Además, *P. vinalillo* resultó similar a *P. alba* y éstas se asociaron con *P. flexuosa* con una distancia genética menor respecto a *P. chilensis*. Dentro de este grupo, *P. velutina* presentó la mas alta diferenciación genética (0.23) en concordancia con la presencia de dos sistemas isoenzimáticos diagnósticos (GOT y PRX).

En el NJ (Figura 3.2 pag. 80) el largo de las ramas permite observar que algunas especies están muy diferenciadas respecto a las demás y que otras presentan muy baja diferenciación genética. *P. reptans* (Strombocarpa), *P. argentina* (Monilicarpa) y *P. kuntzei* (Algarobia Ser. Sericanthae) resultaron muy diferenciadas de las restantes especies de Algarobia estudiadas. Dentro de éste grupo, *P. velutina* fue la especie mas diferenciada. Las restantes especies de Algarobia estudiadas presentaron bajos niveles de diferenciación genética (parte ampliada de la Figura 3.2). En todos los casos, las poblaciones coespecíficas mostraron distancias genéticas menores que las poblaciones de diferentes especies. *P. velutina* resultó asociada a *P. glandulosa* pero la distancia genética es mayor a la presentada entre ésta última y *P. ruscifolia* o *P. nigra* (valores no presentados). Los valores de distancias pueden ser inferidos a partir del largo de las ramas.

En ambos árboles, los agrupamientos observados fueron independientes de la distribución geográfica: en el UPGMA, *P. glandulosa* (USA) resultó más similar a *P. ruscifolia* (Argentina) que a *P. velutina*, la otra especie Norteamericana incluida. En el NJ, éstas resultaron agrupadas entre sí pero la

distancia genética entre las especies Norteamericanas fue mayor que entre las cuatro poblaciones de *P. glandulosa* (USA) y las poblaciones argentinas de *P. ruscifolia* ó *P. nigra*.

P. kuntzei (Algarobia, Sericanthae) es una especie simpátrica que en base a estudios morfológicos no ha demostrado evidencias de hibridación con las restantes especies estudiadas, mostró gran cantidad de loci diagnóstico y por lo tanto el grado de diferenciación genética fue mayor (0.326) respecto a los niveles previamente observados dentro de Algarobia (Saidman 1985, Saidman y Vilardi 1897, 1993, Ferreyra 2001).

Los resultados obtenidos a través de los estudios isoenzimáticos coinciden con la clasificación basada en datos morfológicos al separar claramente a las tres secciones estudiadas (Algarobia, Monilicarpa, Strombocarpa). Sin embargo dentro de Algarobia, ésta no se ajusta completamente a la clasificación en series propuesta por Burkart (1976). Con los resultados aquí obtenidos sólo la serie Sericanthae resultó diferenciada dado que las restantes especies que pertenecen a las series Chilenses y Ruscifoliae no resultaron agrupadas. Aunque la separación en series dentro de la sección Strombocarpa no pudo ser analizada en esta trabajo, otros autores señalaron que la clasificación en series de esta sección no estaría apoyada por evidencias isoenzimáticas (Pocoví 1992; Saidman *et al* 1996) ni por los patrones de electroforesis de semillas (Burghardt, 2000B).

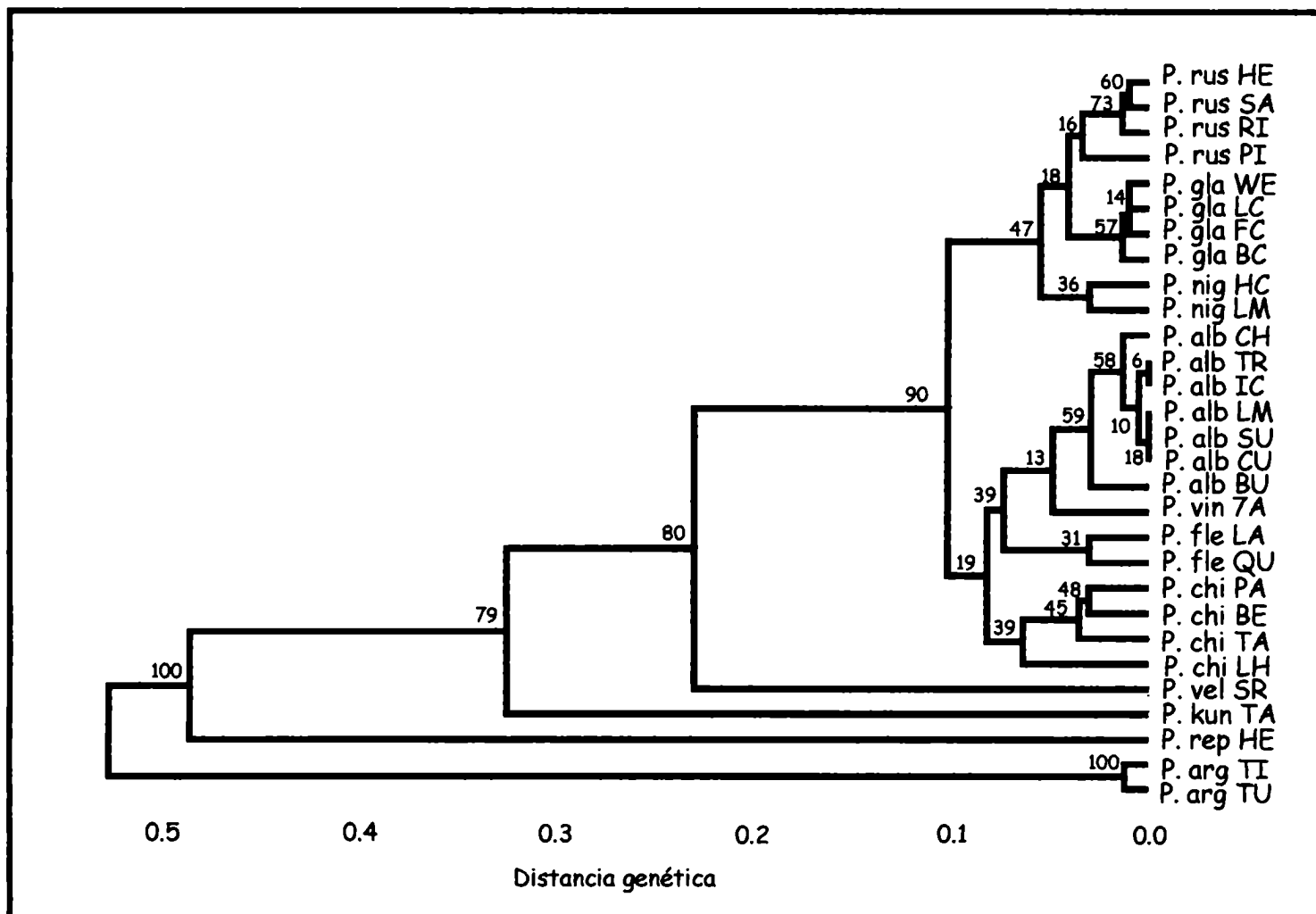


Figura 3.1 UPGMA construido a partir de las distancias genéticas de Nei.
Sobre los nodos se representan los valores de "bootstrap".

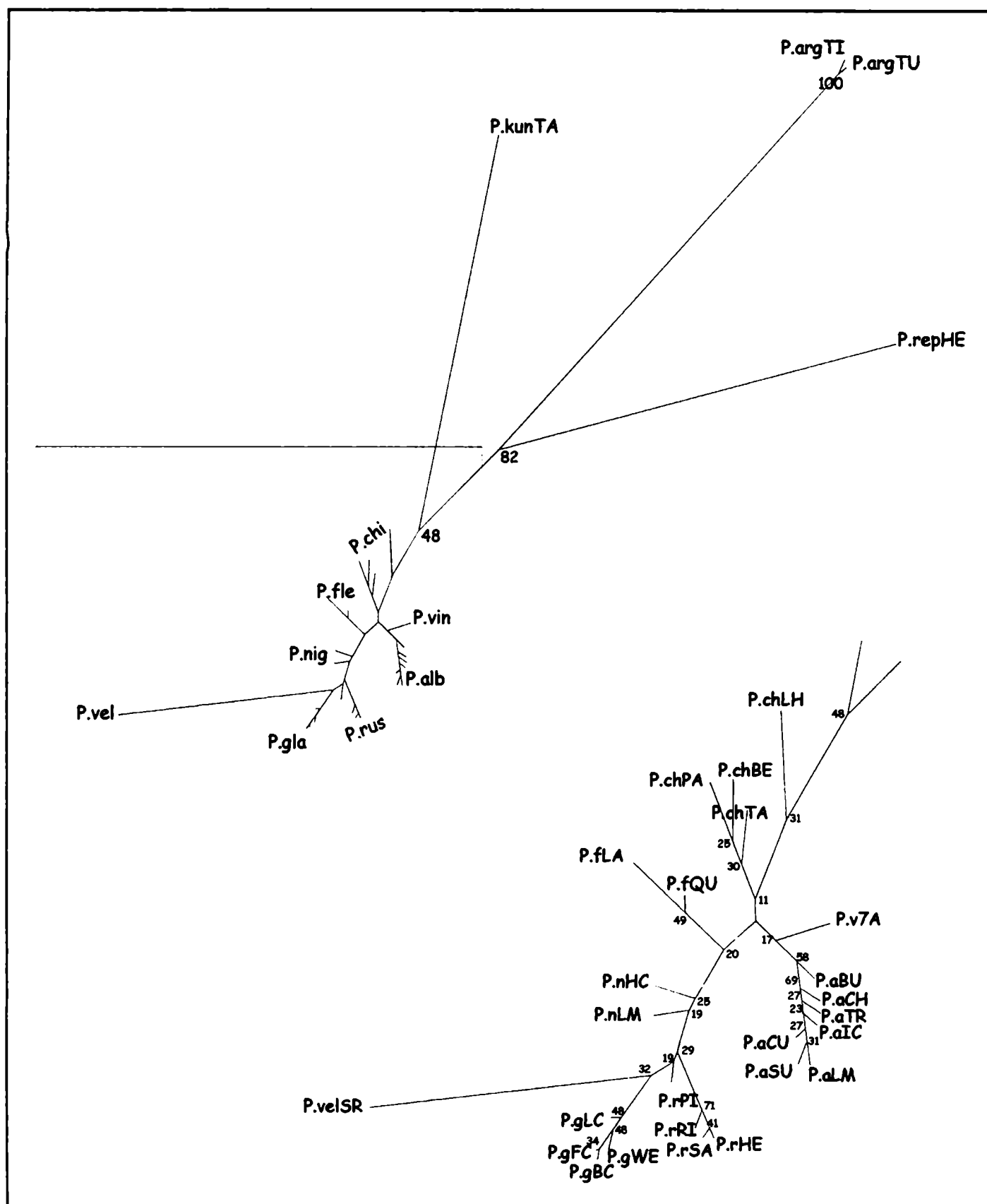
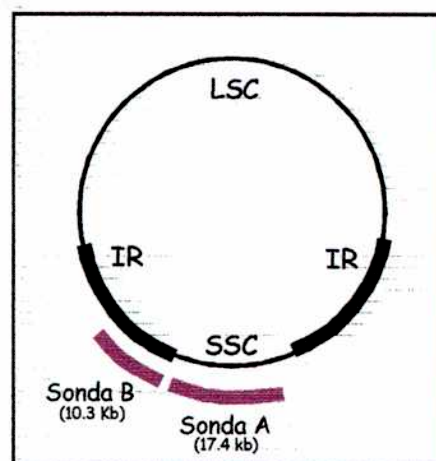


Figura 3.2 Neighbor-Joining (NJ) construido a partir de las distancias genéticas de Nei. Sobre los nodos se representan los valores de bootstrap.

IIb. Polimorfismos Para El Largo De Los Fragmentos De Restricción

Con el fin de incluir un nuevo marcador molecular se analizaron 11 especies de *Prosopis* (Tabla 1.1 pag. 17 tercera fila) por medio de la técnica de RFLP (Apéndice 3D pag. 134).

Se utilizaron dos sondas heterólogas de *Nicotiana tabacum* que fueron donados gentilmente por el Dr. J. J. Doyle (Cornell University, Ithaca, USA). Las sondas incluían varios clones que cubrían una región de la



Representación de las sondas utilizadas.

"Short Single Copy" ó SSC (sonda A) de 17.4 kb y una porción de la región repetida invertida ó IR (sonda B) de 10.3 kb. El tamaño del cloroplasto de *Prosopis* no ha sido descrito pero si se considera que el tamaño de los cloroplastos varía entre 120 y 160 kb (Sugiura, 1992), estas sondas representarían aproximadamente el 17.5 - 23% del genoma de cloroplasto.

Se analizaron un total de 10 enzimas de restricción capaces de reconocer seis (*EcoRI*, *XbaI*, *ScaI*, *PstI*, *BamHI*, *HindIII*) y cuatro pares de bases (*HinfI*, *RsaI*, *AluI*, *HaeIII*). El cpDNA presenta en la mayoría de las angiospermas herencia materna, aunque se ha observado la ocurrencia de herencia paterna o biparental en algunos grupos (Reboud y Zeyl 1994, Morgensen 1996). En el presente trabajo se consideró la herencia materna y se extrajo ADN de aproximadamente 10 semillas hijas, de modo de obtener suficiente cantidad para aplicar esta metodología (1µg). Entre 8 y 10 individuos fueron analizados por especie para las 20 combinaciones enzima-sonda.

detectándose un total de 99 fragmentos (Figura 3.3 pag. 84). La presencia de distintos fragmentos de restricción permitieron definir 30 patrones ó haplotipos. El haplotipo más común en cada caso fue llamado A y los restantes fueron nombrados en orden de aparición. En la Tabla 3.1 se indican los fragmentos que conformaron cada uno de los patrones encontrados y en la Tabla 3.2 se indica en que especies fue hallado cada uno de ellos.

	Enzima	Patrón	Tamaño fragmentos
Sonda A	AluI	A	2.01; 1.31; 0.91; 0.81; 0.56
	RsaI	A	3.38; 1.9; 1.69; 1.48; 1.17; 1.07; 0.91; 0.71; 0.55
		B	3.38; 2.5; 1.78; 1.69; 1.48; 1.17; 1.07; 0.91; 0.71; 0.55
		C	3.38; 1.78; 1.69; 1.48; 1.17; 1.07; 0.91; 0.55; 0.47
		D	3.38; 2.1; 1.48; 1.30; 1.07; 0.91; 0.71; 0.55
	EcoRI	A	4.27; 1.95; 1.74; 1.3; 0.78
		B	1.44; 1.34; 0.8; 0.5; 0.45; 0.38; 0.27
		C	1.3; 1; 0.9; 0.5; 0.45; 0.38; 0.27; 0.19
	HaeIII	A	2.95; 2.14; 2.03; 1.45; 1.12; 0.65; 0.50
		B	2.95; 2.09; 1.45; 1.12; 0.65; 0.50
		C	2.95; 2.09; 1.97; 1.45; 1.12; 0.95; 0.65; 0.50
	HinfI	A	1.34; 0.90; 0.8; 0.50; 0.45; 0.38; 0.27
		B	1.44; 1.34; 0.8; 0.5; 0.45; 0.38; 0.27
		C	1.3; 1; 0.9; 0.5; 0.45; 0.38; 0.27; 0.19
	HindIII	A	11.4; 6.7; 0.9
	PstI	A	21; 2.37; 1.94
	BamHI	A	4.79; 4.17; 2.0; 1.9
Sonda B	ScaI	A	12.5; 6.3; 4.6; 2.04
	XbaI	A	18.6; 11.48; 1.78
	EcoRI	A	4.07; 2.66; 1.41; 1.35; 1.17; 0.77
		B	4.07; 2.66; 1.41; 1.35; 1.23; 0.77; 0.66
	HinfI	A	2.29; 0.74; 0.67; 0.60; 0.42; 0.39; 0.29
	AluI	A	1.1; 0.29; 0.23; 0.21
	HaeIII	A	2.04; 1.86; 1.12; 0.81; 0.47; 0.42; 0.27
	RsaI	A	2.39; 1.30; 1.09; 0.50
	PstI	A	21
	BamHI	A	4.57; 2.82; 2.03; 1.53
	XbaI	A	18.2; 17.1
	HindIII	A	12.6; 1.35; 1.20
	ScaI	A	10; 5.6

Tabla 3.1. Patrones de restricción y tamaño de los fragmentos (en kb).

El nivel de variabilidad detectado por esta metodología en general fue bajo, y en ningún caso se encontró variación intraespecífica. Las once especies de *Prosopis* analizadas presentaron variación para la sonda A en cuatro enzimas de restricción (EcoRI, HinfIII, Rsa I y HaeIII) mientras que para la sonda B, sólo presentó variación la enzima EcoRI (indicado en negrita en la Tabla 3.2). De las especies estudiadas sólo *P. kuntzei* (Algarobia, Sericanthae) y *P. reptans* (Strombocarpa) pudieron ser reconocidas mediante los patrones de restricción. Esto señala una alta similitud genética entre las restantes especies a nivel de cpDNA.

SondaA	<i>P.alb</i>	<i>P.rus</i>	<i>P.vin</i>	<i>P.nig</i>	<i>P.gla</i>	<i>P.fle</i>	<i>P.cai</i>	<i>P.aft</i>	<i>P.alp</i>	<i>P.kun</i>	<i>P.rep</i>	<i>A.aro</i>
EcoRI	A	A	A	A	A	A	A	A	A	B	B	C
HinfI	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	B	C
XbaI	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
ScaI	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
PstI	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
BamHI	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	B
Rsa I	A	A	A	A	A	A	A	A	A	B	C	D
HindIII	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
AluI	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
HaeIII	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	B	C

SondaB	<i>P.alb</i>	<i>P.rus</i>	<i>P.vin</i>	<i>P.nig</i>	<i>P.gla</i>	<i>P.fle</i>	<i>P.cai</i>	<i>P.aft</i>	<i>P.alp</i>	<i>P.kun</i>	<i>P.rep</i>	<i>A.aro</i>
EcoRI	A	A	A	A	A	A	A	A	A	B	B	B
HinfI	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
XbaI	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
ScaI	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
PstI	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
BamHI	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
Rsa I	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
HindIII	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
AluI	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
HaeIII	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A

Tabla 3.2. Patrones de restricción hallados en cada especie

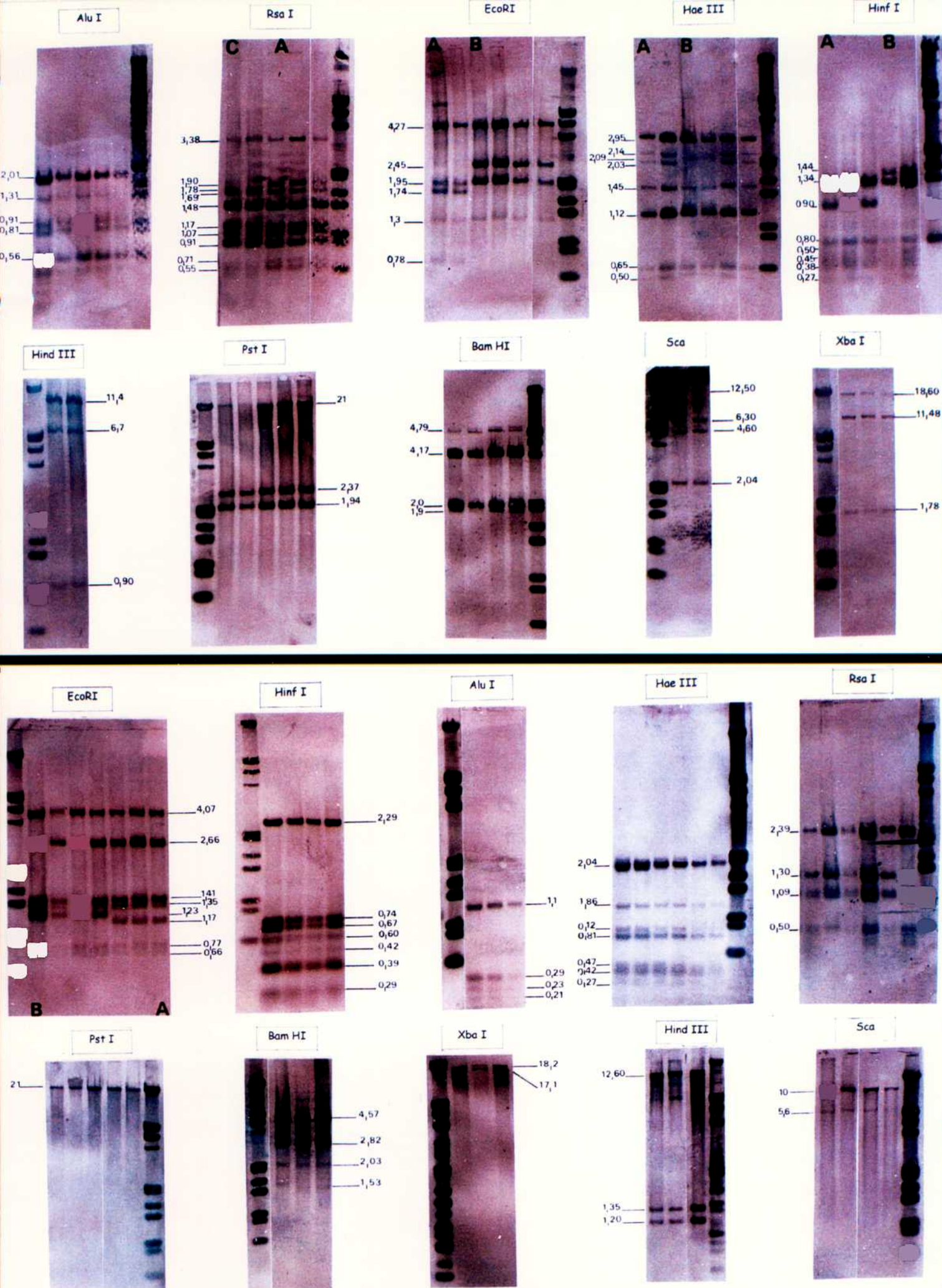


Figura 3.3 Patrones obtenidos por RFLP para cada enzima.

La parte superior corresponde a la sonda A y la parte inferior a la sonda B. Se detallan los pesos moleculares (kb).

Los resultados de este análisis fueron volcados en una matriz de presencia y ausencia de fragmentos (Apéndice 4 pag. 150) y utilizados para construir un cladograma tomando como "outgroup" la especie *Acacia aroma*. El criterio para construir el árbol fue la máxima parsimonia considerando los caracteres no ordenados y todos igualmente pesados (Parsimonia de Fitch) a través de un algoritmo de búsqueda exacto "Branch and Bound". El soporte de las ramas fue estimado por el método de "bootstrap" (Felsenstein, 1985) y el nivel de homoplasia medido a través de los índices de consistencia (CI) y de retención (R) (Apéndice 3M pag. 130). El cladograma se realizó utilizando el programa PAUP (versión win-PAUP 4b-8)(Swofford, 1998).

Como resultado se obtuvo un único árbol parsimonioso (Figura 3.4) con 37 pasos cuyo índice de consistencia considerando todos los caracteres fue de 0.946 y 0.833 al excluir los caracteres no informativos. El índice de retención fue de 0.867; y todos los valores de "bootstrap" obtenidos fueron altos por lo que se consideró que el árbol obtenido era confiable. El árbol indicó una separación temprana de *P. reptans* (Sección Strombocarpa) respecto a las restantes especies estudiadas pertenecientes a la sección Algarobia con un valor de bootstrap del 68%. *P. kuntzei* (Serie Sericanthae) se separó tempranamente de las restantes especies de Algarobia pertenecientes a las series Chilenses, Ruscifoliae y Pallidae con la robustez máxima posible (100%). Los marcadores estudiados mediante esta metodología no permitieron diferenciar ni reconstruir la filogenia de las restantes nueve especies de la sección Algarobia ya que resultaron en una policotomía.

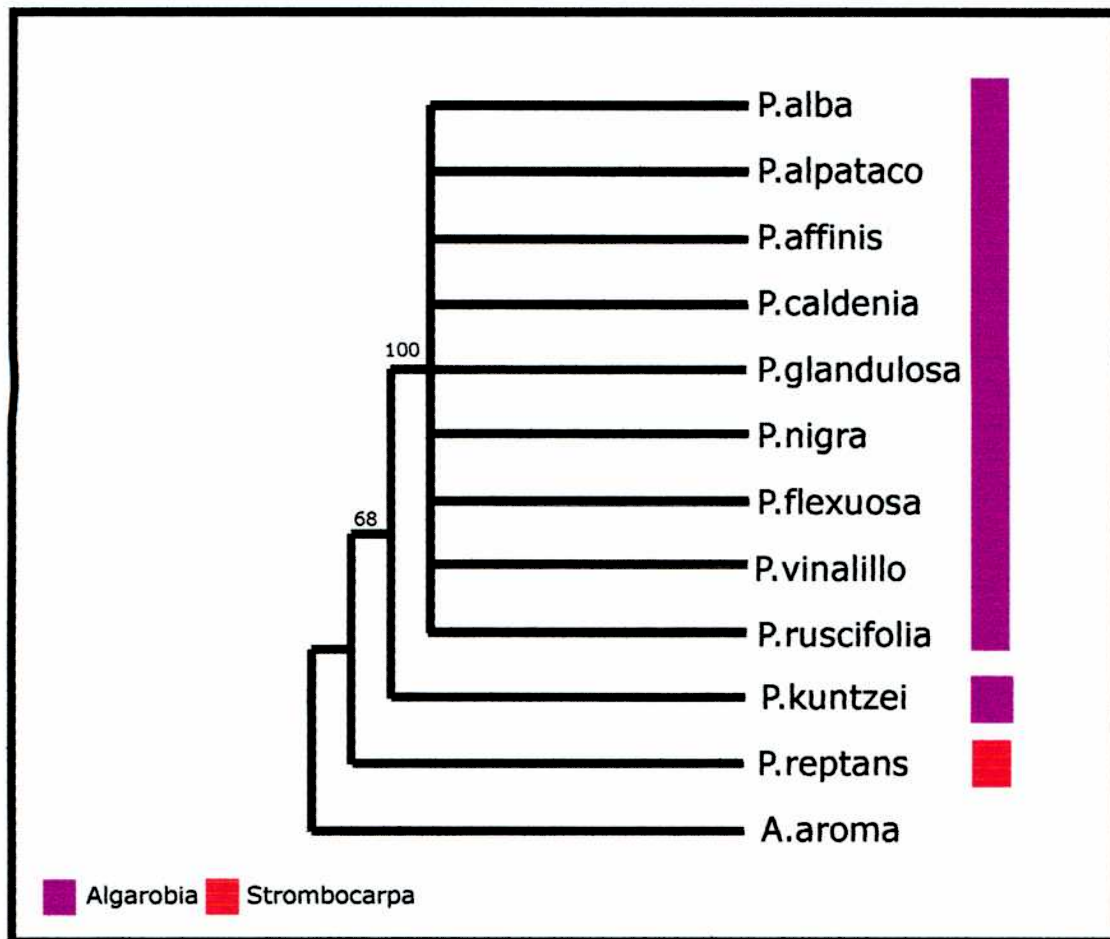


Figura 3.4. Cladograma obtenido a partir de los datos de RFLP utilizando el método de máxima parsimonia. Los valores sobre los nodos indican los resultados del "bootstrap".

IIc. Secuenciación De Intergen *TrnT-TrnD* (CpDNA)

Tomando en cuenta que el nivel de variación detectado a nivel de cpDNA utilizando regiones codificantes y no codificantes a través de la técnica de RFLP fue bajo, fue necesario buscar y estudiar otra región que presentara una tasa de evolución mas alta y que pudiera brindar mayor cantidad de datos para poder inferir las relaciones entre las especies de la Sección Algarobia.

Recientemente muchos autores han utilizado exitosamente distintas regiones no codificantes de ADN de cloroplastos para reconstruir filogenias a

niveles taxonómicos intragenéricos e intraespecíficos (Gielly y Taberlet 1994, 1996, Soltis y Soltis 1998, Soltis *et al* 1998, Bayer *et al* 2000, Richardson *et al* 2000) debido al mayor nivel de variación presentado por estas regiones. Existen muchos cebadores ó "primers" universales diseñados para amplificar regiones que demostraron gran ventaja por su nivel de variación (Taberlet *et al* 1991, Demesure *et al* 1995, Petit *et al* 1998) y en el presente trabajo se estudió el intergén *TrnT-TrnD*.

El intergén *TrnT-TrnD*, que está ubicado en la región LSC (long single copy) del cloroplasto, fue amplificado en 13 individuos correspondientes a las especies descritas en el Capítulo 1 (Tabla 1.1 pag. 17 fila 4). La metodología y las secuencias de los "primers" utilizados se describen en el Apéndice 3 pag 137. El fragmento amplificado (1300 pb.) fue parcialmente (707 pb) secuenciado por la empresa ANAGEN Technologies (<http://www.ana-gen.com>). Una vez interpretados los cromatogramas, las secuencias fueron alineadas utilizando el programa ClustalW (Thompson *et al* 1994). La matriz alineada se presenta en el Apéndice 4 (pag. 150). Al igual que en estudio de RFLP la especie *Acacia aroma* fue utilizada como "outgroup".

Al alinear las secuencias se detectaron 16 inserciones/deleciones (indels) que involucraron una sola base. De ellas solamente dos se refieren a diferencias entre el grupo externo y el interno. Además, se detectaron dos indels de 3 pb que diferenciaron *A. aroma* de las especies de *Prosopis*. *P. reptans* presenta un indel de 23 pb que no está presente en ninguna de las restantes especies aunque en la misma región todas las especies de *Prosopis* aquí estudiadas presentan un indel de 4 pb.

A partir de los datos de secuencia, utilizando el programa PAUP (Swofford, 1998), se calcularon las distancias genéticas no corregidas entre las secuencias (distancias-P) y se realizó un análisis cladístico utilizando el método de máxima parsimonia de Fitch. Los indels fueron analizados de dos formas diferentes, la primera sin ningún tipo de codificación y la segunda codificando los mismos (Apéndice 2N pag. 131) para evitar la ocurrencia de información repetida (Simmons y Ochoterena, 2000). El soporte de los grupos se estimó por el método de "bootstrap" (Felsenstein, 1985) y el nivel de homoplasia se evaluó a través de los índices de consistencia (CI) y de retención (R).

	<i>A. aro</i>	<i>P. alb</i>	<i>P. rus</i>	<i>P. vin</i>	<i>P. fle</i>	<i>P. kun</i>	<i>P. nig</i>	<i>P. gla</i>	<i>P. rep</i>	<i>P. cal</i>	<i>P. aff</i>	<i>P. alp</i>	<i>P. vel</i>
<i>P. alb</i>	0.095												
<i>P. rus</i>	0.089	0.012											
<i>P. vin</i>	0.120	0.067	0.059										
<i>P. fle</i>	0.087	0.022	0.013	0.050									
<i>P. kun</i>	0.103	0.060	0.048	0.063	0.043								
<i>P. nig</i>	0.088	0.025	0.016	0.051	0.009	0.045							
<i>P. gla</i>	0.090	0.034	0.026	0.046	0.015	0.042	0.015						
<i>P. rep</i>	0.084	0.039	0.028	0.062	0.026	0.044	0.022	0.032					
<i>P. cal</i>	0.113	0.021	0.033	0.075	0.039	0.068	0.043	0.048	0.057				
<i>P. aff</i>	0.098	0.005	0.013	0.069	0.021	0.060	0.024	0.033	0.037	0.022			
<i>P. alp</i>	0.109	0.041	0.037	0.059	0.039	0.059	0.045	0.042	0.048	0.048	0.039		
<i>P. vel</i>	0.092	0.031	0.022	0.057	0.018	0.043	0.015	0.023	0.029	0.049	0.030	0.051	
<i>P. arg</i>	0.096	0.039	0.030	0.047	0.024	0.044	0.023	0.032	0.034	0.057	0.038	0.062	0.020

Tabla 3.3. Distancias genéticas no corregidas entre las secuencias (distancias-P)

Cuando se comparan las distancias genéticas entre las especies de *Prosopis* con el "outgroup" la divergencia genética varía entre 0.084 y 0.120. Las distancias genéticas entre las especies estudiadas de la sección Algarobia variaron entre 0.005 (*P. affinis* - *P. alba*) y 0.075 (*P. vinalillo* - *P. caldenia*) resultando el valor promedio para esta sección de 0.038. Cuando se compara la

distancia genética entre todas las especies de *Algarobia* y *P. reptans*, la única especie incluida de *Strombocarpa*, ésta resultó en 0.038. Este valor es semejante al mostrado entre esta última especie y *P. argentina*, la única especie de *Monilicarpa* (0.034) y a la distancia genética promedio observada entre todas las especies de *Algarobia* estudiadas y *P. argentina* (*Monilicarpa*) (0.0378).

Cuando se realizó el análisis cladístico considerando a los "gaps" como quinto estado a partir de los 707 caracteres obtenidos, 521 resultaron constantes (73.7%) y sólo 70 resultaron filogenéticamente informativos (9.9%). Mediante un método exacto (Branch and Bound) se obtuvo un único árbol mas parsimonioso con 287 pasos (Figura 3.5). El índice de consistencia considerando todos los caracteres fue de 0.75 y cuando se excluyeron los caracteres no informativos el mismo fue de 0.54. El índice de retención fue 0.52.

El cladograma (Figura 3.5) sugiere que *P. reptans* (*Strombocarpa*) es la especie que ha divergido con anterioridad a las restantes especies estudiadas (87%) sugiriendo que las secciones *Algarobia* y *Monilicarpa* son derivadas respecto a *Strombocarpa*. Además, el árbol muestra a *P. argentina* (*Monilicarpa*) incluida dentro del clado formado por las especies de la Sección *Algarobia*. Dentro de las especies de *Algarobia* estudiadas, *P. kuntzei* fue la especie diferenciada mas tempranamente (87%). Las restantes especies de *Algarobia* forman un clado dónde *P. velutina* es la especie que ha divergido en tiempos mas tempranos respecto a las restantes (31%). Mas hacia adentro en el árbol, se distinguen dos grupos aunque presentaron bajos valores de "bootstrap", uno incluyó a las especies *P. vinalillo*, *P. alpataco*, *P. glandulosa* y *P.*

flexuosa y *P. nigra* (11%) y el otro a *P. alba*, *P. caldenia*, *P. affinis* y *P. ruscifolia* (48%). Aunque la mayor parte de las relaciones establecidas entre las especies de *Algarobia* estudiadas no presentaron altos valores de "bootstrap", algunas relaciones resultaron bien sostenidas: *P. alba* resultó especie hermana de *P. caldenia* (65%) y estas últimas de *P. affinis* (68%).

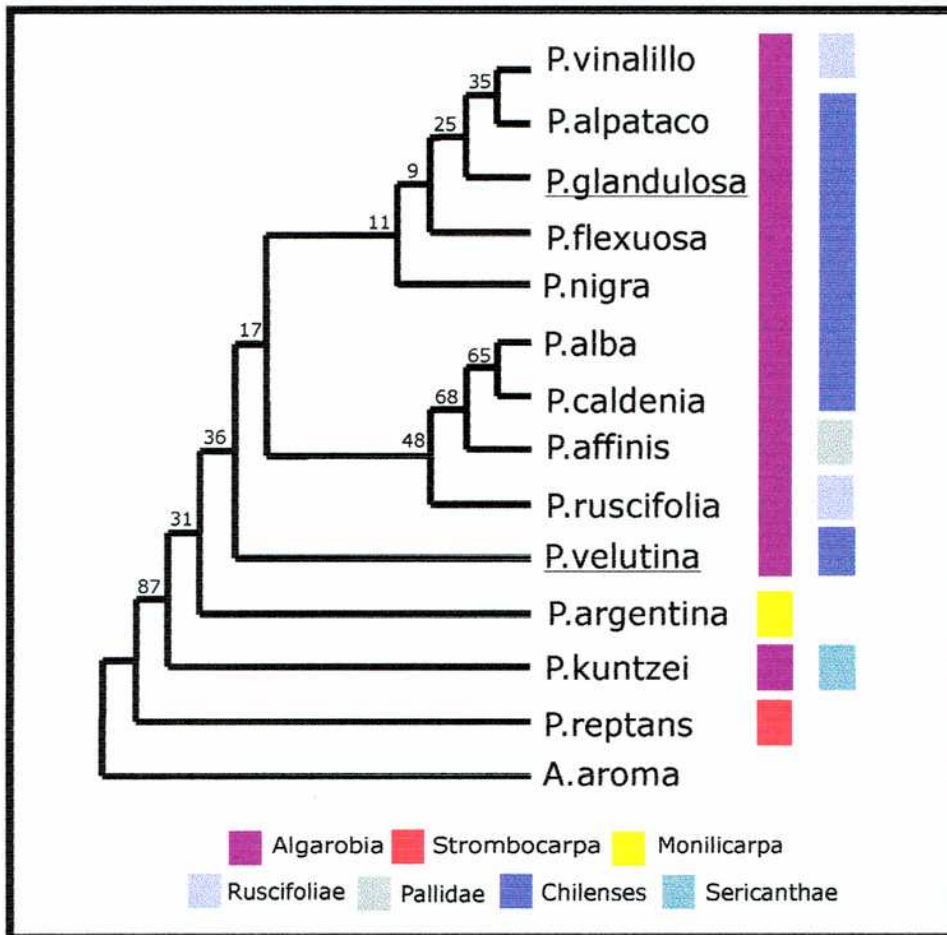


Figura 3.5. Cladograma obtenido a partir de las secuencias del intergén *TrnT-TrnD* utilizando método de máxima parsimonia. Los valores sobre los nodos indican los resultados del "bootstrap".

Cuando los "gap" fueron tratados como datos ausentes así como cuando los "indels" fueron codificados siguiendo el método mas simple (Simmons y Ochoterena 2000) la topología de los árboles mas parsimoniosos obtenidos fue prácticamente idéntica. Además, cuando se analizaron las relaciones fenéticas

entre estas especies a través de un NJ (distancias-P), mostraron relaciones concordantes.

IIIId. Secuenciación De Los Espaciadores Internos No Transcriptos Del ADN Ribosómico (ITS-1 e ITS-2)

La comparación de filogenias realizados a partir de diferentes "sets" de datos es fundamental para poder garantizar la obtención de la filogenia del grupo y no la filogenia de los genes estudiados dado que se espera que los loci genéticos no ligados evolucionen independientemente y éstos se transmitan de modo diferencial a la descendencia (Pamilo y Nei 1988). Las filogenias obtenidas a partir de diferentes grupos genómicos brindan distinto tipo de información y las hipótesis a probar y las conclusiones obtenidas se ven enriquecidas (Soltis *et al*/1998).

El ADN ribosómico eucarionte presenta cientos de copias repetidas en tándem de la unidad transcripcional y de los espaciadores no transcriptos. Dentro de la unidad transcripcional existen dos espaciadores internos (ITS-1 e ITS-2) que separan los genes 18S, 5.8S y 26S (Figura 3.6). Estos espaciadores forman parte del transcripto ribosómico pero no forman parte de la estructura final del mismo. Su función ha sido relacionada con la maduración de los ARNr al permitirles un acercamiento a las subunidades del ARNr.

Las diferentes regiones del ADNr presentan diferencias en la tasa evolutiva siendo las subunidades pequeñas (18S) las que evolucionan mas lentamente, las subunidades mayores (26S) lo hacen con una tasa de evolución

mayor y las regiones espaciadoras tienen una tasa evolutiva aún mas alta que permiten inferir filogenias entre taxones cercanamente relacionados (Hillis y Dixon 1991). Los cistrones ribosómicos suelen estar ubicados en las regiones organizadoras nucleolares (NOR) y pueden estar representados en varios cromosomas diferentes (Thomson y Flavell 1988).

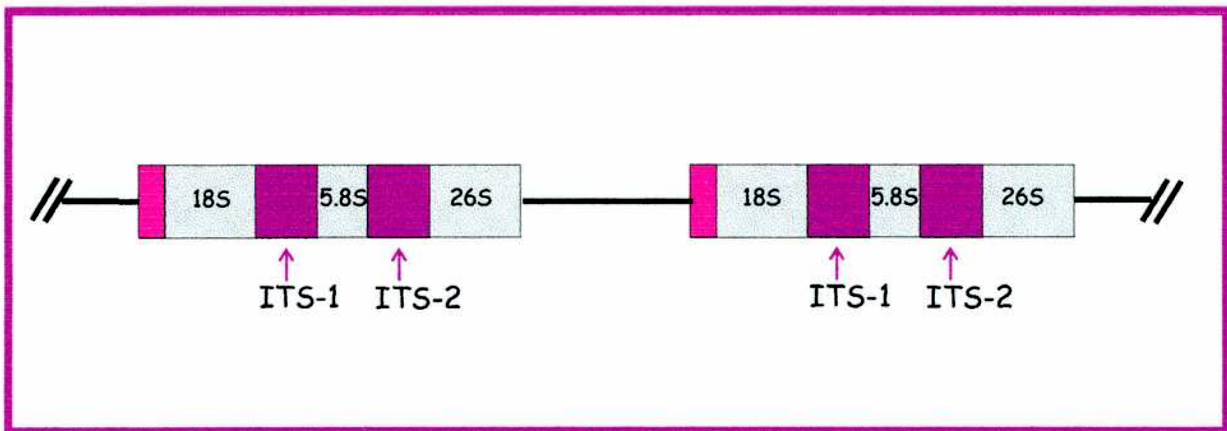


Figura 3.6. Diagrama esquemático de una repetición de ADN ribosómico en plantas.

Dentro de un organismo existe una alta similitud en la secuencia de los cistrones. Esta homogeneidad está dada por un proceso conocido como evolución concertada (Arnheim *et al*/1980, Zimmer *et al*/1980). Los mecanismos posibles implicados en este proceso incluyen el cruzamiento desigual, conversión génica, transposición y "slipagge" o patinaje, aunque la proporción con la que contribuye cada mecanismo aún no está clara. La homogenización completa de los loci ribosómicos es una ventaja que permite la utilización de este marcador para inferir filogenias ya que la ausencia de variantes alélicas simplifica notablemente la tarea.

Los espaciadores internos no transcritos del ADN ribosómico (ITS1-ITS2) son regiones nucleares que presentan algunas ventajas que los hacen

útiles para estudiar las relaciones filogenéticas. Pueden ser amplificados y secuenciados de un modo relativamente sencillo y dado el nivel de variabilidad que presentan han sido utilizado exitosamente para reconstruir filogenias de diferentes géneros (Noyes 2000, Wen 2000, Hardig y Soltis 1999, Baldwin *et al*/1995, Andelberg *et al*/2000, Stanford *et al*/2000, Watson *et al*/2000,)

En el presente trabajo se secuenciaron los ITS-1 e ITS-2 de 13 especies del género *Prosopis* (Tabla 1.1 pag 17 fila 4) y se tomó como grupo externo la secuencia de *Phaseolus vulgaris* disponible en la base de datos GenBank. Aunque el análisis se realizó utilizando las secuencias de un único individuo de cada especie, en algunos casos (*P. alpataco* y *P. vinalillo*) se analizaron mas de un individuo para comprobar si existía variación intraespecífica, no encontrándose dicha variación. A partir de las secuencias se calcularon las distancias genéticas y se realizó un análisis de parsimonia (Fitch) donde los "gaps" fueron considerados como quinto estado utilizando una vez mas el programa PAUP (Swofford, 1998). Como en los casos anteriores se estimó el valor de "bootstrap" para cada nodo y se calcularon los índices de consistencia y retención del árbol mas parsimonioso (Apéndice 2M pag. 130).

La medida de distancia genética mas simple es el valor P que no suele involucrar ninguna corrección. El cálculo de distancias a través del método de Kimura 2 parámetros (Kimura 1980) supone que la frecuencia de las bases es equivalente y que la relación entre la ocurrencia de transiciones y transversiones no lo es. El valor que toma la relación Ti/Tv en este modelo equivale a 2. Dado que este modelo ha sido utilizado para los ITS con mayor frecuencia en la literatura (Noyes 2000, Wen 2000, Hardig y Soltis 1999, Leskinen y Alstrom-Rapaport 1999, Yang *et al*/1999, Hao *et al*/2000, Hardig *et*

al 2000) es el que se presenta en este trabajo (Tabla 3.4), aunque los resultados con otros valores de distancia son coincidentes.

Las distancias genéticas entre las especies estudiadas de la sección *Algarobia* variaron entre 0.036 (*P. alpataco* - *P. velutina*) y 0.521 (*P. vinalillo* - *P. kuntzei*) resultando el valor promedio para esta sección de 0.278. Cuando *P. kuntzei* fue excluida, el mayor valor de distancia genética ocurrió entre *P. alba* y *P. vinalillo* (0.366).

	<i>Ph.vul</i>	<i>P.cal</i>	<i>P.nig</i>	<i>P.aff</i>	<i>P.alb</i>	<i>P.vin</i>	<i>P.gla</i>	<i>P.rus</i>	<i>P.alp</i>	<i>P.vel</i>	<i>P.kun</i>	<i>P.fle</i>	<i>P.arg</i>
<i>P.cal</i>	0.999												
<i>P.nig</i>	0.942	0.213											
<i>P.aff</i>	0.912	0.172	0.142										
<i>P.alb</i>	0.927	0.227	0.244	0.218									
<i>P.vin</i>	1.144	0.207	0.319	0.241	0.366								
<i>P.gla</i>	0.903	0.207	0.050	0.133	0.234	0.319							
<i>P.rus</i>	1.031	0.139	0.214	0.194	0.307	0.126	0.204						
<i>P.alp</i>	0.900	0.174	0.192	0.169	0.160	0.356	0.188	0.261					
<i>P.vel</i>	0.944	0.182	0.155	0.169	0.177	0.330	0.159	0.239	0.036				
<i>P.kun</i>	1.159	0.377	0.292	0.300	0.331	0.521	0.294	0.428	0.328	0.343			
<i>P.fle</i>	0.993	0.236	0.160	0.197	0.237	0.355	0.145	0.255	0.154	0.131	0.392		
<i>P.arg</i>	1.019	0.296	0.254	0.236	0.287	0.462	0.251	0.355	0.253	0.276	0.332	0.296	
<i>P.rep</i>	1.413	0.539	0.504	0.531	0.538	0.624	0.470	0.563	0.525	0.490	0.596	0.520	0.587

Tabla 3.4. Distancias genéticas estimadas a través del método de Kimura-2 parámetros.

Cuando se comparó la distancia genética entre todas las especies de *Algarobia* y *P. reptans*, la única especie incluida de *Strombocarpa*, ésta resultó en 0.536. Este valor es semejante al mostrado entre esta última especie y *P. argentina*, la única especie de *Monilicarpa* (0.587). Por el contrario, la distancia genética promedio observada entre las especies de *Algarobia* y *Monilicarpa* fue menor a las dos estimas anteriores y semejante al valor presentado entre las especies de *Algarobia* (0.297).

El análisis cladístico de los datos de secuencia de los ITS dio como resultado dos árboles igualmente parsimoniosos compuesto por 967 pasos. De los 496 caracteres incluidos en la matriz básica de datos, 74 (14.9%) fueron constantes, 207 no informativos (41.73%) y 215 fueron informativos (43.35%).

Los dos cladogramas obtenidos sólo diferían en la posición de *P. affinis* dado que los datos aquí utilizados no resultaron capaces de brindar la correcta relación de esta especie. En la figura 3.7 se presenta el árbol consenso de ambos cladogramas cuyo índice de consistencia fue 0.70 y 0.59 al excluir los caracteres no informativos. El índice de retención fue 0.49.

Del cladograma surge que *P. reptans* ha divergido con anterioridad (95%) respecto a las especies de *Algarobia* y *Monilicarpa* señalando una anterior separación de la sección *Strombocarpa* respecto a estas secciones.

P. argentina de la sección *Monilicarpa* queda incluida en el clado formado por las especies de *Algarobia* con un valor de soporte para este nodo del 95%. El árbol muestra a *P. kuntzei* como especie hermana de *P. argentina* (confiabilidad para este nodo =70%).

Dentro de *Algarobia*, excluyendo a *P. kuntzei*, se pueden distinguir tres clados. El primero está integrado por *P. vinalillo*, *P. ruscifolia* y *P. caldenia* y el segundo por *P. alpataco*, *P. velutina* y *P. alba*. El tercero, diferenciado con anterioridad de los otros dos, lo conforman *P. nigra*, *P. glandulosa* y *P. flexuosa*. Aunque los valores de "bootstrap" no son altos (<50%) para todas los eventos de divergencia señalados, ciertas relaciones presentan altos soportes. De este modo, *P. vinalillo* resulta especie hermana de *P. ruscifolia* (100%) y

éstas de *P. caldenia* (100%); *P. alpataco* hermana de *P. velutina* (98%) y *P. nigra* hermana de *P. glandulosa* (96%).

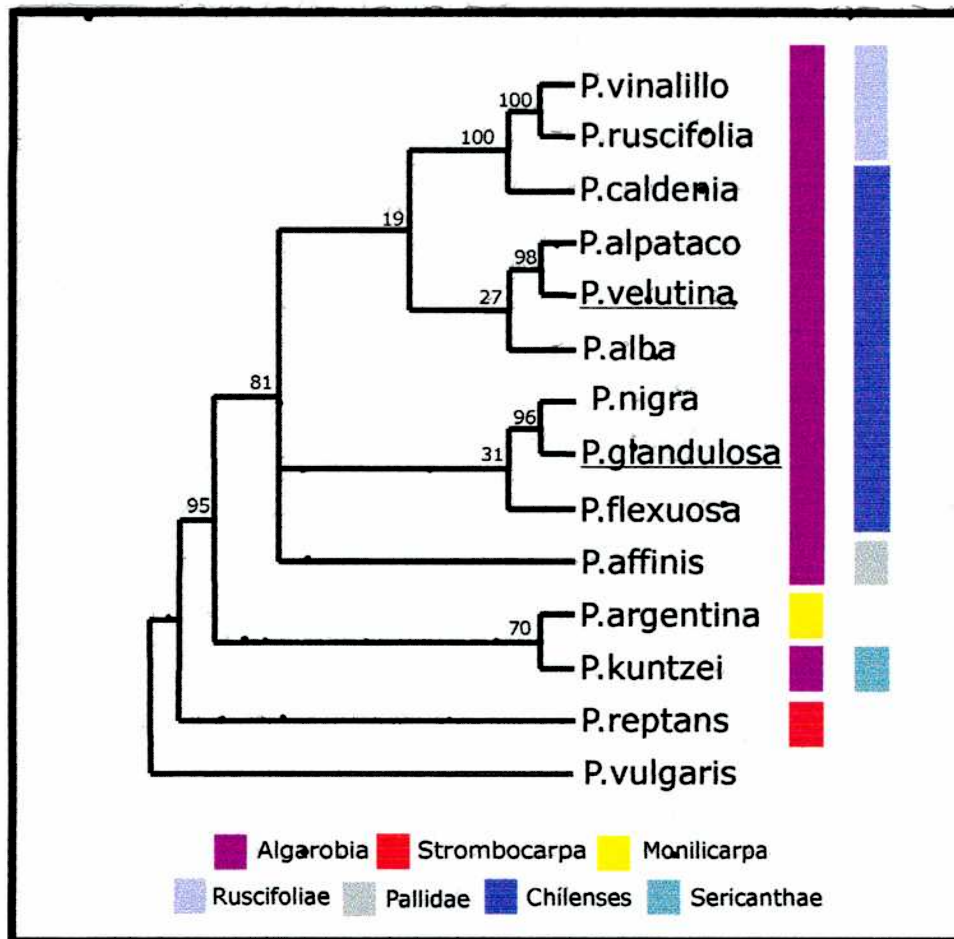


Figura 3.7. Cladograma consenso obtenido por el método de máxima parsimonia a partir de las secuencias de ITS-1 e ITS-2.

El análisis fenético utilizando las distancias K-2P (no presentado) dio un árbol que se ajustó parcialmente al árbol mas parsimonioso. Al igual que en árbol de MP, tanto *P. velutina* con *P. alpataco* como *P. vinalillo* con *P. ruscifolia* resultaron asociadas con altos valores de bootstrap (92% y 100% respectivamente). Estas últimas resultaron mas similares a *P. caldenia* (100%) y *P. nigra* resultó similar a *P. glandulosa*. Sin embargo, a diferencia del árbol de MP, el NJ señaló que *P. kuntzei* y *P. reptans* son mas similares entre sí que

con *P. argentina* aunque los valores de bootstrap de estas asociaciones resultaron menores a 50%.

IIId. Congruencia Entre Arboles

Los fenogramas contruidos a partir de los datos isoenzimáticos fueron analizados junto a los cladogramas obtenidos a partir de los datos de RFLP y secuencias. La reconstrucción filogenética realizada a partir de datos de RFLP no permitió resolver las relaciones entre la mayoría de las especies de *Algarobia* dado el bajo nivel de variabilidad presentado por la sonda elegida que incluía tanto regiones codificantes como no codificantes. De acuerdo con esto, se secuenció parcialmente el intergén *TrnT-TrnD* que permitió resolver la policotomía encontrada entre estas especies. A fin de contrastar las filogenias de diferentes grupos genómicos se realizó también la reconstrucción filogenética a partir de la secuencia de los espaciadores transcriptos internos del ADN ribosómico.

A simple vista las topologías de los árboles obtenidos a partir de los datos de organela y nucleo no son coincidentes (Figura 3.8). La congruencia entre los cladogramas surgidos a partir de cada "set" de datos fue medida a través de la prueba de parsimonia menos significativa (SLP_T) propuesta por Templeton (1983) (Apéndice 2^o pag. 131). Este método permite probar si los datos disponibles proveen un soporte significativamente menor para una topología alternativa en comparación con el árbol mas parsimonioso. Como resultado se obtuvo que la topología obtenida a partir de los datos de la secuencia intergénica *TrnT-TrnD* es significativamente diferente de la obtenida a partir de los datos de secuencia de los ITS ($p < 0.001$).

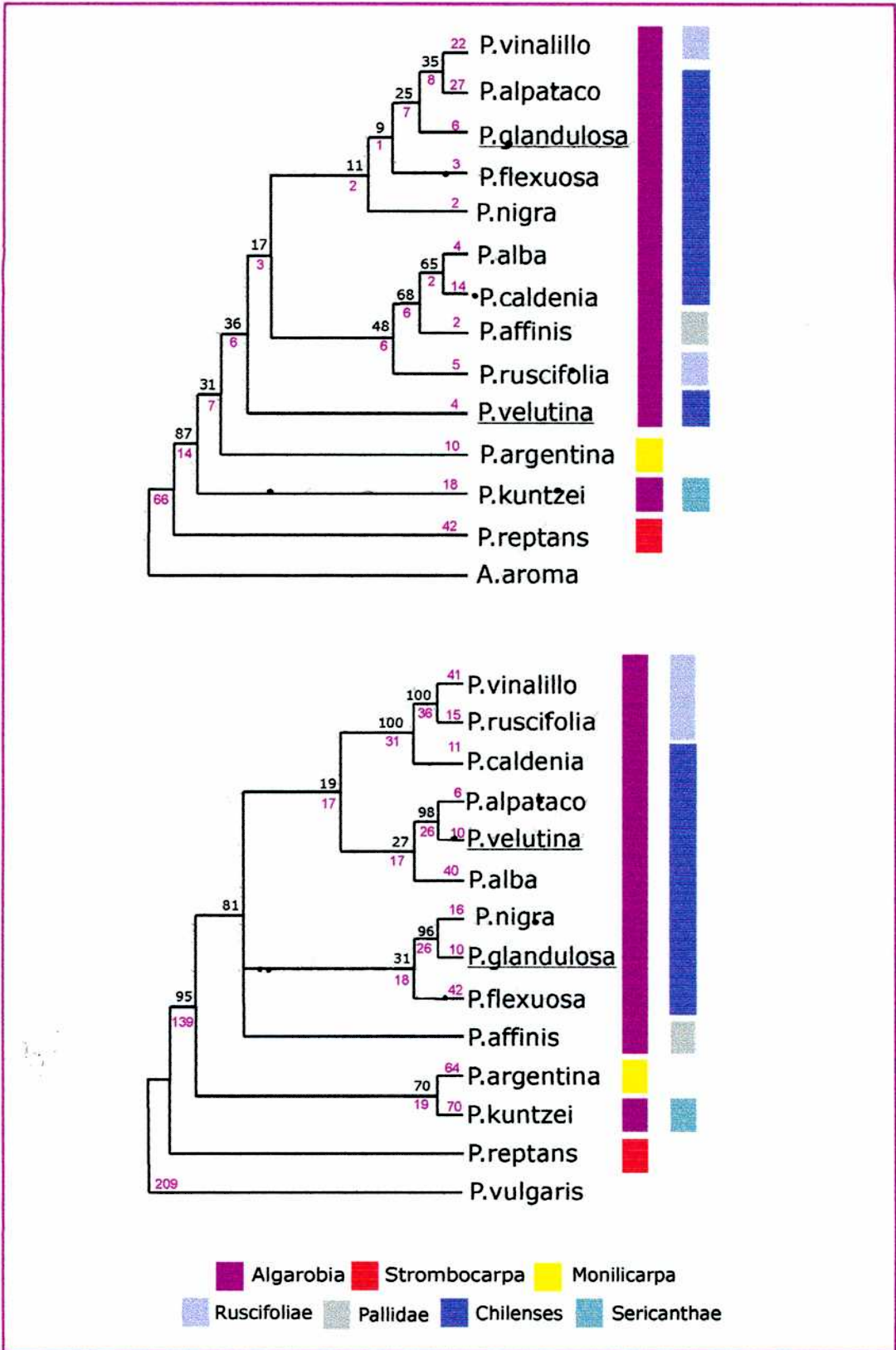


Figura 3.8. Cladogramas obtenidos a partir de datos de secuencia de *TrnT-TrnD* (parte superior) e ITS-1 e ITS-2 (parte inferior). Sobre los nodos se indica la robustez de la hipótesis filogenética (bootstrap) y sobre las ramas, el número de sustituciones nucleotídicas ocurridas.

Aunque las topologías resultaron incongruentes, es posible describir algunos puntos en común entre ellos y los fenogramas obtenidos. En los cladogramas *P. reptans* (Strombocarpa) es una especie basal hermana de un clado formado por todas las especies de *Algarobia* incluidas en este estudio y *P. argentina* (Monilicarpa). Además *P. glandulosa* y *P. velutina* (ambas especies Norteamericanas) no forman un clado en ninguno de los dos árboles. Los fenogramas (UPGMA y NJ) obtenidos a partir de las isoenzimas están de acuerdo con ambos cladogramas al mostrar diferenciadas las especies pertenecientes a las diferentes secciones.

Diferentes hipótesis alternativas fueron probadas utilizando la prueba de parsimonia menos significativa (SLP_T) (Templeton 1983), y discutidas considerando las evidencias brindadas por las diferentes metodologías disponibles. Así, es posible abordar la discusión previamente planteada acerca de si *P. vinalillo* es una especie de origen híbrido. La hipótesis de que *P. vinalillo* es una especie de origen híbrido entre *P. ruscifolia* y *P. alba* var. *panta* fue planteada por Burkart (1976) a partir de datos morfológicos. Los árboles obtenidos a partir de las isoenzimas (Figuras 3.1 y 3.2) mostraron a *P. vinalillo* muy similar a *P. alba* conformando un mismo grupo. Estos hechos podrían apoyar la idea de que *P. alba* fuera una de las especies progenitoras. Sin embargo, la divergencia genética entre ellas estimada mediante las secuencias de ITS resultó una de las mas altas dentro de *Algarobia* (0.366) y en ningún cladograma, que señala las relaciones de ancestralidad-descendencia, *P. alba* resultó hermana de *P. vinalillo*. Por el contrario, cuando esta asociación fue forzada sobre los datos del intergén y de los ITS los árboles resultantes fueron significativamente menos parsimoniosos ($p < 0.012$ y $p=0.0001$). Por otro lado, *P. ruscifolia* no resultó tan similar desde el punto de vista isoenzimático

pero formó un grupo hermano con *P. vinalillo* en el árbol basado en las secuencias de ITS. Cuando esta asociación fue forzada en el árbol de cpDNA, el árbol obtenido no resultó significativamente diferente ($p = 0.1671$). Resultados previos basados en la técnica de RAPD (Ferreyra 2001) mostraron que *P. vinalillo* presenta una mayor similitud con *P. nigra* y *P. ruscifolia* que con *P. alba*. Basándose en los resultados aquí obtenidos y en los antecedentes por RAPD, no surge que *P. alba* sea una de las especies progenitoras de *P. vinalillo*.

También es posible discutir en base a estos resultados la ocurrencia de más de un evento de colonización entre Norte y Sudamérica. Las reconstrucciones filogenéticas aquí obtenidas no muestran asociadas a las especies de acuerdo a la ubicación geográfica actual. Las especies norteamericanas *P. glandulosa* y *P. velutina* resultaron en ambos casos más relacionadas con especies Sudamericanas de diferentes grupos, sugiriendo que ellas no son derivadas entre sí y que debió ocurrir mas de un evento de colonización. Sin embargo cuando se probó la posibilidad de que ambas especies formen un clado a través del SLP_T, los datos de cpDNA dieron diferencias no significativas ($p > 0.226$) y los datos de ITS mostraron que los árboles obtenidos son significativamente menos parsimoniosos ($p < 0.0001$) siendo el árbol nuclear el que presenta mayor cantidad de caracteres informativos y mayores valores de "bootstrap" para la mayoría de los grupos.

Los datos isoenzimáticos fueron concordantes. Aunque el árbol resultante de las similitudes genéticas (NJ) muestra a *P. glandulosa* asociada a *P. velutina*, éstas se encuentran muy diferenciadas (el largo de las ramas brinda una idea de la distancia genética). *P. glandulosa* presenta mayor similitud genética con las especies Sudamericanas que con la Norteamericana

P. velutina (Figura 3.2). Esta misma asociación se observó también en el UPGMA (Figura 3.1). La información disponible señala que *P. glandulosa* y *P. velutina* tendrían diferentes orígenes.

Finalmente, es posible analizar si las secciones son grupos naturales, considerando todas las evidencias aquí obtenidas. Las isoenzimas señalaron que *P. argentina*, *P. reptans* y *P. kuntzei* están bien diferenciadas de las restantes especies resultando alejadas en los fenogramas. Los cladogramas por el contrario coincidieron en que *P. reptans* es una especie ancestral pero la ubicación de *P. argentina* y *P. kuntzei* no fue la misma en los árboles de organela y núcleo. A primera vista ninguno de los dos cladogramas (*TrnT-TrnD* e ITS-1 e ITS -2) reflejan la separación en secciones propuestas por Burkart (1796). A fin de que la clasificación en secciones concuerde con estas reconstrucciones filogenéticas, *P. argentina* debería pertenecer a Algarobia o *P. kuntzei* no pertenecer a ella. Cuando *P. argentina* fue forzada a formar un grupo hermano con *P. kuntzei* sobre los datos de cpDNA, tal como aparece en el árbol de los ITS, el árbol resultante no fue significativamente menos parsimonioso ($p=1$). Sin embargo, cuando se probó la hipótesis de que *P. argentina* forme un grupo hermano con *P. reptans*, las diferencias tampoco resultaron significativas en ninguno de los dos árboles ($p>0.077$ en cpDNA y $p=0.093$ en ITS). Esto sugiere que la posición de *P. argentina* debe ser considerada cuidadosamente y que un número mayor de caracteres deben ser analizados. Ni las relaciones cladísticas ni las fenéticas obtenidas en este trabajo reflejan la clasificación en series propuesta por Burkart (1976) en base a la morfología en concordancia con trabajos previos (Saidman y Vilardi 1987, Ferreyra, 2001, Burghardt 2000A).

Muchas veces existe incongruencia entre los cladogramas obtenidos a partir de diferentes regiones del genoma y esto no implica que la historia de las secuencias moleculares no sea la correcta pues el "árbol de los genes" no siempre coincide con el "árbol de las especies". Sin embargo, la incongruencia también puede explicarse por causas técnicas y/o biológicas. La incongruencia técnica (Wendel y Doyle 1998) puede estar dada por la porción del genoma que se elige para estudiar o por el largo de la secuencia que se analiza. En ambos casos los datos resultan insuficientes y llevan a reconstrucciones erróneas. En el presente estudio, las regiones analizadas han demostrado ser útiles en estudios filogenéticos de especies relacionadas y el número de caracteres incluidos es semejante a los empleados en la literatura (Smith 2000, Wen 2000, Anderberg *et al* 2000, Bayer *et al* 2000, Richardson *et al* 2000). Sin embargo, el número de caracteres informativos brindados por el intergén resultó mas bajo (10%) que el de los ITS (43%) y como consecuencia, los valores de soporte de ramas fueron mucho mayores en el árbol nuclear que en el árbol de cpDNA (Figura 3.8).

Otro factor técnico importante puede ser la calidad de las secuencias (Clark y Whittam 1992). En particular, cuando se analizan secuencias de taxones recientemente divergentes suelen elegirse porciones genómicas que presenten altas tasas de sustitución tal como los intrones o los intergenes. Estas zonas son ventajosas al proveer caracteres informativos pero, al ser regiones no codificantes, es difícil registrar errores en los alineamientos ya que no es posible realizar los controles de alineación que sí pueden realizarse cuando se trabaja con regiones codificantes (codones). Además, estas zonas suelen presentar alta frecuencia de inserciones y deleciones (indels) que dificultan el alineamiento. En cuanto a las secuencias aquí obtenidas, el

alineamiento de las mismas se realizó sin dificultad a pesar de no ser regiones codificantes; además, los indels pudieron ser codificados de modo simple cuando fue necesario.

Por otra parte, la incongruencia por causas biológicas son comunes en la literatura. Se han encontrado muchos casos de incongruencia en los resultados filogenéticos basados en evidencia nuclear y de cpDNA y estudios mas profundos en estos grupos de especies indicaron que la misma se debía a la ocurrencia de hibridación e introgresión (Rieserberg y Soltis 1991, Wendel y Doyle 1998). En Algarobia, se describieron varios ejemplos de hibridación natural entre especies (Palacios y Bravo 1981, Hunziker *et al* 1986) y resulta consistente con la incongruencia encontrada entre los árboles de los ITS y el intergén de cpDNA. Aunque la hibridación actual pueda modificar el escenario y llevar a reconstrucciones no reales, es necesario considerar eventos de hibridación durante el proceso de especiación. Si éste fuera el caso en este grupo, tal como ha sido planteado previamente por otros autores (Ferreyra 2001), uno podría explicar la falta de congruencia entre los árboles de organela y núcleo entendiendo que cada uno de ellos representa un linaje diferente, así para las relaciones incongruentes, el árbol de *TrnT-TrnD* indicaría la línea materna y el árbol de ITS podría verse afectado por diferentes procesos que involucren la contribución de ambos progenitores. Además, las reconstrucciones filogenéticas construidas mediante el método de máxima parsimonia pueden verse significativamente distorsionadas cuando la evolución es del tipo reticulada, dado que este método, se basa en relaciones jerárquicas de descendencia en donde las especies divergen dicotómicamente sin volver a ponerse en contacto.

Sin embargo la hibridación no es el único proceso que puede opacar las reconstrucciones filogenéticas. Si las especies de *Prosopis* evolucionaron en un tiempo relativamente corto a partir de un antecesor común que fue polimórfico para un carácter molecular (por ejemplo el intergén o los ITS), se espera que las especies incipientes posean diferentes moléculas de la diversidad existente (Neigel y Avise 1986, Harrrison 1991). Con el tiempo y siguientes extinciones de los linajes génicos, las poblaciones que descienden dividirán de manera aleatoria las secuencias nucleares y de organelas independientemente de la filogenia real de los organismos. Este proceso estocástico de división de linajes se conoce como clasificación de linajes ó "lineage sorting" (LS). Este mecanismo puede afectar tanto a los genes nucleares como a los de organela. Existen pocos ejemplos de polimorfismos de cpDNA (Mason-Gamer *et al* 1995, Levy *et al* 1996) dada la baja tasa de evolución del mismo y aunque para algunos genes nucleares distintos autores (Gaut y Clegg 1993, Buckler y Holtsford 1996) obtuvieron topologías consistentes con "LS", en todos los casos se discute la alternativa de ocurrencia de flujo génico interespecífico dado que este proceso deja señales sobre la topología de los árboles semejantes a las de otro mecanismo tal como la introgresión. Aunque la comparación de los datos basados en la organela y en el núcleo ha sido propuesto como un método capaz de identificar hibridación (Rieserberg y Brunsfeld 1992) es imposible distinguir inequívocamente entre la introgresión y el "LS" basado únicamente en las relaciones filogenéticas.

Por último, también puede observarse incongruencia si la diversificación de un grupo ocurre en un tiempo corto. La radiación rápida sugiere que una población ampliamente distribuida ha sido fragmentada en poblaciones aisladas geográficamente ó que la diversificación ocurrió rápidamente luego del

surgimiento de una adaptación ecológica o morfológica novedosa (Wendel y Doyle 1998). Esta explicación es consistente con los resultados obtenidos. El cladograma basado en RFLP (utilizando como sonda regiones codificantes y no codificantes) permitió diferenciar a las especies *P. reptans* y *P. kuntzei* y no a las restantes especies de *Algarobia*. Es sabido que el genoma de cloroplasto resulta útil para realizar análisis filogenéticos al permitir hallar polimorfismos para el largo de los fragmentos de restricción debido al alto nivel de conservación de secuencias que posee. Sin embargo, no proveen suficiente variación como para permitir inferir la filogenia cuando se comparan géneros o especies poco diferenciadas (Palmer 1987, Brettin *et al* 2000). Para identificar polimorfismos adicionales se pueden utilizar las zonas mas variables tales como las regiones no codificantes de cpDNA que en general presentan un aumento en la frecuencia de polimorfismos por sustitución de bases una vez y media mayor que las regiones codificantes (Gielly y Taberlet 1994, Wolfe *et al* 1987). De acuerdo con esto, el cladograma basado en la secuencia del intergén *TrnT-TrnD* permitió resolver la policotomía encontrada a través de RFLP entre la mayor parte de las especies de *Algarobia* estudiadas. Por lo tanto, los resultados a nivel de cloroplasto sugerirían que las especies estudiadas de *Algarobia* han especiado recientemente. Si éste fuera el caso, la gran diferenciación morfológica que presentan las especies podría interpretarse como una radiación rápida en donde fuerzas evolutivas diferenciales permitieron el surgimiento de adaptaciones ecológicas y morfológicas novedosas dando lugar a las especies que se distinguen actualmente.

Capítulo 4

Discusión General

Estudios bioquímicos previos realizados en especies pertenecientes a las secciones Algarobia, Strombocarpa y Monilicarpa mostraron diferencias en los parámetros genético-poblacionales (Saidman 1985, Saidman y Vilardi 1987, Burghardt y Palacios 1991, Verga 1995, Julio 2000, Ferreyra 2001, Burghardt 2000A, 2000B). Aquí una especie de la sección Strombocarpa (*P. reptans*) fue estudiada simultáneamente con la única especie de la sección Monilicarpa (*P. argentina*) y trece especies de Algarobia utilizando marcadores bioquímicos y moleculares. Los estudios isoenzimáticos muestran a las especies de Algarobia estudiadas dentro del rango descrito para otras especies de la sección ($\bar{H}=0.13-0.28$ y $P=38-62\%$) aunque *P. kuntzei* presenta estimas menores. Además, las especies de Algarobia muestran valores de heterocigosis media significativamente diferentes de Monilicarpa y de *P. reptans*, la única especie estudiada de Strombocarpa. Sin embargo, *P. argentina* (Monilicarpa) y *P. reptans* (Strombocarpa) muestran valores de variabilidad genética similares.

La diferenciación isoenzimática entre las especies de Algarobia, medida a través de la distancia genética de Nei (1972), fue relativamente baja con valores que oscilan entre los de sub o semi especies (Ayala *et al* 1974, Avise 1975). Dentro de Algarobia, *P. kuntzei* es la especie mas diferenciada (0.326) en concordancia con Burghardt y Palacios (1996). Sin embargo, estos autores señalan que la diferenciación es semejante a la presentada entre *P. argentina* (Monilicarpa) y las restantes especies de Algarobia, hecho que aquí no se observa (0.52). La similitud genética entre especies de esta sección no se ajusta a lo esperado en función de las series morfológicas propuestas por Burkart (1976) (Apéndice 1 pag. 125).

La diferenciación genética medida a través de isoenzimas entre poblaciones de *P. argentina* fue levemente menor a la de las restantes especies de Algarobia previamente estudiadas (Ferreyra 2001). Como consecuencia, el flujo génico estimado entre sus poblaciones fue mayor. *P. argentina* (Monilicarpa) y *P. reptans* (Strombocarpa) presentan la mayor diferenciación genética con respecto a las otras especies estudiadas y la distancia genética entre las especies incluidas de Algarobia y cualquiera de ellas es de la misma magnitud. Estudios bioquímicos previos (Burghardt y Palacios 1996) avalan la separación de *P. argentina* en una sección diferente según los niveles de aislamiento genético y la presencia de un patrón electroforético característico con bandas marcadoras. La alta diferenciación entre Strombocarpa y Algarobia a nivel isoenzimático también fue señalada por Hunziker *et al* (1996) y Saidman *et al* (1996); y la mayor parte de las especies de Strombocarpa están claramente diferenciadas existiendo una buena cantidad de loci diagnósticos entre ellas. Únicamente *P. reptans* y *P. strombulífera* parecerían no llegar a ser "buenas especies" (Burkart 1976, Saidman 1985, Burghardt y Palacios 1996).

En este trabajo se estudiaron mediante RAPD cuatro poblaciones Norteamericanas de *P. glandulosa* y una población de *P. velutina*. En concordancia con resultados isoenzimáticos previos, los niveles de variabilidad genética resultaron similares a los registrados en las especies Sudamericanas de Algarobia y en todos los casos las estimas fueron relativamente altas ($H=0.151-0.215$, $P=37.8\%-55.6\%$, $A=1.4-1.7$). Los estudios de diferenciación entre poblaciones de *P. glandulosa*, medidos a través del F_{ST} , señalaron la ocurrencia de diferenciación genética y el Nm estimado fue mayor a un migrante por

generación señalando la ocurrencia de flujo génico entre las poblaciones coespecíficas.

Cuando se estudiaron las relaciones fenéticas mediante RAPD (Ferreyra 2001), se encontró falta de consistencia con la clasificación morfológica al no observarse asociaciones de acuerdo a las series al igual que en los estudios isoenzimáticos. Sin embargo, a diferencia de estos últimos, esta técnica ha permitido distinguir loci característicos de Secciones (Ramírez *et al* 1999) y combinaciones de bandas que permiten identificar a *P. ruscifolia*, *P. alba*, *P. nigra* y *P. flexuosa*. Por el contrario, no se ha encontrado un patrón diagnóstico de *P. vinalillo* con los "primers" ensayados (Ferreyra 2001). Aquí las especies Norteamericanas estudiadas, no pudieron ser distinguidas por los patrones de bandas y sólo variaron en las frecuencias alélicas.

Los estudios isoenzimáticos y de RAPD permitieron analizar la estructura poblacional a través de los estadísticos F (Wright 1951) en poblaciones de *P. nigra*, *P. alba*, *P. flexuosa*, *P. chilensis*, *P. ruscifolia*, *P. glandulosa*, *P. velutina* y *P. vinalillo* (Saidman 1985, Saidman y Vilardi 1987, Verga 1995, Julio 2000, Bessega *et al* 2000A y Bessega *et al* 2000B, Ferreyra 2001). En la mayor parte de los casos, los valores de F_{IS} obtenidos fueron positivos y significativos. Estos resultados señalan una tendencia general a un exceso de homocigotas dentro de las poblaciones que podrían deberse a cierto nivel de endogamia.

Dado que por mucho tiempo estas especies fueron consideradas de fecundación cruzada obligada (Burkart 1976, Simpson 1977) la explicación del exceso de homocigotas observado en algunas especies de *Algarobia* fue

analizada a través del estudio del sistema de apareamiento. Simpson en 1977 señaló que las especies pertenecientes a la sección *Algarobia* son protóginas y presentan fecundación cruzada obligada. Sin embargo, este punto de vista contrasta con el presentado por Genisse *et al* (1990) quienes indicaron que las especies de *Algarobia* no serían protóginas. Estos autores aceptan que las mismas presentan fecundación cruzada obligada y que esta característica estaría determinada por algún sistema de autoincompatibilidad.

Al igual que en los estudios isoenzimáticos previos (Saidman 1985, 1986, 1988, 1990, 1993, Saidman y Vilardi 1987, 1993, Saidman *et al* 1997, 1998B, Verga 1995, Keys y Smith 1994), todas las poblaciones estudiadas en el presente trabajo mostraron exceso de homocigotas para las poblaciones de semillas hijas ($F_{ISO} > 0$) sugiriendo altos niveles de endogamia. Esta endogamia puede esperarse si existe cierta estructura familiar dentro de las poblaciones, pero también podría estar provocada por la ocurrencia de cierto nivel de autofecundación. Esta última posibilidad parece estar apoyada por diferentes estudios de polinización que mostraron que *P. glandulosa*, *P. laevigata* (Galindo-Almanza *et al* 1992) y *P. velutina* (Keys y Smith 1994) no son totalmente autoincompatibles.

La importancia relativa de la estructura familiar y la autofecundación fue medida a través de los parámetros del sistema de apareamiento en *P. alba*, *P. glandulosa*, *P. nigra*, *P. flexuosa*, *P. velutina*, *P. ruscifolia* y *P. chilensis* (Bessegga *et al* 2000C). Las estimas de tasa de exogamia (fecundación cruzada) no variaron según se calcularan a partir de un único locus (t_s) o varios simultáneamente (t_m). Entre las diferentes especies t_m varió entre 0.72 y 1. Las estimas obtenidas en el presente trabajo son similares a los valores

obtenidos por Keys y Smith (1994) para poblaciones de *P. velutina*. Los rangos de las estimas de *Prosopis* son similares también a las estimadas para arbustos y otros árboles (Prémoli 1996, Doliguez y Joly 1997) así como también en otras leguminosas entomófilas (Moran *et al* 1989, Surles *et al* 1990, Godt y Hamrick 1991, Krueger y Knapp 1991, Young y Brown 1998).

Considerando las estimas de este trabajo junto con las de *P. velutina* previamente descritas (Keys y Smith 1994), el valor promedio para t_m es de 0.81. Este valor indica que alrededor del 19% de autofecundación puede ocurrir en todas las especies estudiadas; este valor es compatible con el exceso de homocigotas observado en la población de semillas hijas. La similitud observada entre las estimas t_m y t_s sugieren que el exceso de homocigotas no se debe a endogamia biparental.

Sin embargo, el exceso de homocigotas observado no puede explicarse solamente por autofecundación. Como se indicó en la introducción del capítulo 2, la tasa de autofecundación (S) puede ser estimada por diferencia a partir de los valores de T ($S = 1 - T$). Aquí, la tasa de exogamia multilocus ó fecundación cruzada varió entre 0.28 y 0 siendo el valor promedio 0.15. Como consecuencia, si las poblaciones se encuentran en equilibrio, el coeficiente de endogamia esperado (F) debido a autofecundación parcial puede estimarse de acuerdo con la ecuación $F = S / (2-S)$ (Hedrick 1983 pag. 94) y cuando s es igual a 0.15 el valor de F correspondiente es 0.081. Sin embargo, las estimas de F_{IS} para las especies incluidas en este trabajo variaron entre 0.175 y 0.391 (Tabla 2.6) con un valor promedio de 0.312. La diferencia entre estos dos valores (0.081 y 0.312) deberían ser atribuidas a subestructura poblacional. De acuerdo con ésto y dado que las especies presentan predominantemente

fecundación cruzada, el exceso de homocigotas observado debe ser atribuido tanto a estructura poblacional como a la ocurrencia de autofecundación.

El análisis conjunto de las tasas de fecundación cruzada (tm , ts), la correlación de paternidad por exocruza (rp) y la correlación de tm dentro de los grupos fraternos (rt) permiten sugerir que la mayor parte de los individuos dentro de las progenies son hermanos completos y no medio hermanos. Esto puede ser consecuencia de la autofecundación parcial y la limitada dispersión del polen que favorece los cruzamientos entre vecinos cercanos resultando en una estructura familiar importante. La falta de diferenciación entre las frecuencias alélicas del polen y el óvulo es compatible también con la hipótesis de dispersión de polen limitada. Además, la tasa de fecundación cruzada varía entre plantas madres, probablemente debido a variación micro-espacial en la densidad poblacional y/o factores ecológicos. De este modo, las plantas mas aisladas tendrán tasas de autofecundación mayores que aquellas plantas ubicadas en parches mas densos.

En condiciones naturales se espera que el nivel de autofecundación aumente cuando un grupo es autocompatible y cuando la dispersión del polen es limitada. Esto podría suceder en *Prosopis* dada la existencia de autocompatibilidad parcial en algunas especies (Galindo-Almanza *et al* 1992, Keys y Smith 1994) y la dispersión del polen por vía entomofílica que determina que el mismo no pueda normalmente migrar largas distancias (Genisse *et al* 1990). Otro factor adicional que podría hacer aumentar la endogamia en este género es la vía endozoica de dispersión de las semillas.

En todas las especies aquí estudiadas el coeficiente de endogamia de la población madre (F_{ISM}) fue mucho menor que el de la población hija correspondiente (F_{ISO}). Las diferencias observadas entre F_{ISM} y F_{ISO} permiten sugerir una explicación alternativa para el mantenimiento de la variabilidad genética en las especies. El cambio aquí observado entre las frecuencias genotípicas de un estado a otro podría ser determinado selectivamente. Los cambios en los coeficientes de endogamia entre muestras adultas y de semillas pueden ser relacionados con un fenómeno denominado "depresión por endogamia" (Ritland 1989, 1990). Este fenómeno es común en plantas con flor (Schemske 1983, Johnston 1992, Hamilton y Mitchel-Odds, 1994, Husband y Schemske 1995) y los índices de fijación suelen ser buenos indicadores de la ocurrencia de este mecanismo (Latta y Ritland 1994). Así, si la población adulta se encuentra en equilibrio, la estima de F indica la aptitud o "fitness" de los individuos obtenidos por autofecundación en relación a aquellos obtenidos por fecundación cruzada (Ritland 1990). Kittelson y Maron (2000) describieron la ocurrencia de este fenómeno en *Lupinus* (Fabaceae) al encontrar que los valores de F no eran significativamente diferentes de cero y sugirieron la ocurrencia de selección para los heterocigotas o en contra de los individuos surgidos por autofecundación. Ritland (1989), estudiando los valores de F para 10 poblaciones de tres géneros de plantas herbáceas, encontró valores que variaban entre 0 y 0.84, mientras que para *Mimulus guttatus* y *M. nasutus* los valores estimados fueron significativamente menores a 0.5, el valor necesario para favorecer genes para autofecundación (Ritland 1990). En *Prosopis*, Keys y Smith (1994) también propusieron que en una población de *P. velutina* las fuerzas selectivas favorecerían a las semillas heterocigotas y reducirían la proporción de individuos autofecundados en la población adulta. Sin embargo, para poder aceptar que la selección favorece a

los individuos de fecundación cruzada en las especies estudiadas de la Sección Algarobia es necesario suponer la existencia de una condición de equilibrio para mantener la variabilidad genética a pesar del nivel de autofecundación y la estructura poblacional.

Otro hecho interesante es que en la mayor parte de las especies de Algarobia estudiadas no se ha encontrado gran cantidad de loci diagnósticos isoenzimáticos. Las mismas se diferencian fundamentalmente por variación en las frecuencias alélicas (Saidman 1985, Saidman y Vilardi 1987, Bessega *et al* 2000B, Ferreyra 2001) dando lugar a una alta similitud genética. Esta observación lleva a preguntarse cómo la alta variabilidad genética es mantenida en las especies de la Sección Algarobia estudiadas hasta el momento y por qué las distancias genéticas entre especies son tan bajas como las observadas entre poblaciones coespecíficas de otros géneros (Saidman 1985, 1986, 1988, 1990, 1993, Saidman y Vilardi 1987, 1993, Saidman *et al* 1997, 1998B).

Una posibilidad podría ser que la similitud genética entre estas especies es una consecuencia de la hibridación interespecífica descrita para esta Sección (Hunziker *et al* 1986). Sin embargo, existen evidencias que no apoyan a este mecanismo como la principal causa de esta alta similitud. Las poblaciones tetraploides de *P. juliflora* estudiadas (Saidman *et al* 1997) muestran alta similitud genética con las especies diploides y alopátricas *P. ruscifolia* y *P. caldenia*. En este caso, la hibridación y la introgresión deben ser descartadas como explicación de la similitud presentada dado que la distribución geográfica y el nivel de ploidía no permiten ningún intercambio entre estas especies. Mas aún, estudios de poblaciones argentinas con

diferente status taxonómico y una amplia distribución geográfica indicaron, que las estimas de F_{ST} entre poblaciones coespecíficas alopátricas son mucho menores que los valores registrados para poblaciones parapátricas/simpátricas de diferentes especies que hibridan frecuentemente en la naturaleza (Saidman 1998B, Ferreyra 2001). Además, estudios de especies Norte y Sudamericanas de Algarobia (Bessega 1997, Bessega *et al* 2000B) también indicaron que la alta similitud entre las especies es independiente de la capacidad de hibridar. En ese trabajo se encontró que las distancias genéticas interespecíficas no están correlacionadas con las distancias geográficas. El análisis de poblaciones de *P. glandulosa* de Texas y de *P. ruscifolia* y *P. flexuosa* de Argentina mostraron los mismos niveles de diferenciación entre las especies Sudamericanas y entre éstas con la Norteamericana. Como los fenómenos de hibridación y de introgresión no podrían ocurrir dado el aislamiento geográfico, la similitud entre las especies no pudo ser explicada de acuerdo al flujo génico interespecífico.

Distintos autores han discutido el mecanismo de especiación ocurrido en las especies de *Prosopis*. Solbrig (1972) enfatizó que las disyunciones florísticas entre las regiones desérticas de Norte y Sudamérica son complejas, y probablemente se hayan dado en un largo período de tiempo de modo que ninguna hipótesis pueden explicarlas completamente. El autor describe tres formas para explicar la similitud florística encontrada entre Norte y Sudamérica. El señala que las disyunciones han surgido como consecuencia de un proceso de dispersión a larga distancia, de una distribución continua a través de los trópicos ó de una evolución paralela convergente.

En ese trabajo el autor señala que la dispersión a larga distancia es difícil de probar aunque para él, es la forma mas sencilla de explicar la distribución disyunta entre las especies del desierto de Sonora (USA) y Monte (Argentina). La explicación es simple si no se considera el agente de dispersión, dado que si se excluye al viento, los animales son los únicos agentes capaces de llevar las semillas de un subcontinente al otro y el autor discute la dificultad del transporte por medio de los pájaros. La segunda propuesta considera una distribución a través de un cinturón tropical entre el desierto de Sonora (USA) y el Monte (Argentina). Según Solbrig (1972) existe dificultad para explicar la dispersión a través de barreras climáticas y por lo tanto sugiere que si éste fuera el caso, las áreas secas que existen al abrigo de las montañas en el lado oeste del continente, debieron funcionar como estaciones ("stepping stones") para el movimiento desde el Norte hacia el Sur o viceversa. La explicación alternativa para la distribución disyunta establece que no es un caso de disyunción sino de evolución convergente. Los que proponen esta hipótesis (Barbour 1969) establecen que aquellos elementos tropicales se debieron haber establecido bajo selección de climas similares de las regiones desérticas de los diferentes subcontinentes dando lugar a tipos idénticos. Solbrig (1972) discute el caso de la sección Algarobia, y señala que las especies menos especializadas se encuentran en las regiones méxicas del área tropical y subtropical mientras que las mas especializadas están distribuidas en el Monte (Argentina) y el desierto de Sonora (USA). El señala que esto va acompañado por el desarrollo de especializaciones morfológicas en la estructura de las hojas y el hábitat. Además, se indica que la convergencia no es tan grande como para dudar del diferente origen de las especies de cada subcontinente. Sin embargo, este proceso podría continuar hasta el punto que las especies sean idénticas morfológicamente. Si este fuera el caso, y las

especies parentales se extinguieran la distribución resultante podría confundirse con un caso de dispersión a larga distancia.

Carman y Mabry (1975), estudiando compuestos fenólicos de *P. reptans*, abordaron nuevamente este tema. *P. reptans* var. *cinerascens* habita en USA y *P. reptans* var. *reptans* en Sudamérica. La alta similitud morfológica y química, encontradas a nivel de fenoles, entre estos dos taxones permitió sugerir que la disyunción entre estos dos taxa ocurrió recientemente y sugirieron que éste representa un ejemplo de introducción a larga distancia probablemente por transporte mas que por migración hacia el Norte.

Dicho trabajo establece que la introducción a larga distancia de *P. reptans* en Norteamérica debió ocurrir en un momento diferente al de las restantes especies de *Prosopis* sugiriendo que ocurrieron mas de un evento de inmigración en Norteamérica. Estos autores se basan en que las otras dos especies Norteamericanas de *Strombocarpa*, *P. pubescens* y *P. palmeri* son química y morfológicamente tan diferentes de las mesquites americanas relacionadas a *P. juliflora* (Algarobia) que indicaron que al menos tres introducciones del género hacia el Norte debieron ocurrir aclarando que la dispersión a larga distancia sería un fenómeno frecuente en los grupos que tienen distribuciones disyuntas.

Allí se señala que el origen ancestral de estas especies podría haber estado en Sudamérica dónde la mayor parte de las especies ocurren. Así, la dispersión a larga distancia desde Argentina, probablemente dio lugar a la presencia de *P. reptans* var. *cinerascens* en Norteamérica del mismo modo que

podrían haberse originado todas las demás especies de *Prosopis* de ese subcontinente.

Carman y Mabry (1975) discuten el planteo de Solbrig (1972) quién sugirió que el género *Prosopis* podría haber tenido un origen tropical y que posteriormente se haya dado la migración y especiación hacia el Norte y el Sur. Según ellos, este punto de vista podría explicar la presencia de *P. palmeri* y *P. pubescens* (Strombocarpa) y de las restantes especies de la sección Algarobia Norteamericanas, pero no podría explicar la similitud química y morfológica observada entre las variedades de *P. reptans*.

Las hipótesis planteadas por Solbrig (1972) pueden ser discutidas en función de los resultados disponibles para este grupo de especies de Algarobia. Si el antecesor de las especies de ambos subcontinentes tuvo una amplia distribución a través de las zonas semi-desérticas que se redujo y se subdividió, es difícil explicar la falta de diferenciación en las frecuencias alélicas isoenzimáticas en los extremos de la distribución, es decir entre *P. glandulosa* y *P. velutina* y las especies de Sudamérica estudiadas. Si la dispersión del polen y de las semillas es limitada, como se discutió anteriormente, las especies de los extremos de la distribución se deberían diferenciar de acuerdo al modelo de aislamiento por distancia de Wright (1946). Otra posibilidad es que el antecesor haya estado distribuido en un subcontinente y que haya colonizado el otro continente por medio de una migración trans-trópico como describió Carman y Mabry (1975) para las variedades de *P. reptans*. Un proceso de este tipo fue descrito para el género *Larrea*. Axelroad (1950) ha señalado que la actual existencia de tipos australes, tales como *Larrea*, en América del Norte, pueden ser explicados por

migración trans-tropical hacia fines del Cenozoico y que la dispersión a larga distancia puede haber ocurrido a través de una serie de hábitat semiáridos intermedios apropiados que sirvieron como estaciones (Raven 1963). Sin embargo, otros autores propusieron que la migración trans-tropical ha tenido un origen reciente desde Sud a Norteamérica y que la dispersión ha sido mediada por aves migratorias (Hunziker *et al* 1977, Wells y Hunziker 1977). Esta última propuesta ha sido apoyada por la reconstrucción filogenética basada en la secuencia del gen *rbcl* (Lia *et al* 2001).

La ocurrencia de migración trans-trópico desde Sudamérica hacia el Norte dando lugar a *P. glandulosa* y a *P. velutina* no requiere que las distancias genéticas estén correlacionadas con las distancias geográficas, pero el hecho de que las especies de los diferentes subcontinentes presenten las mismas variantes alélicas en frecuencias isoenzimáticas similares, requiere la ocurrencia de muchos eventos de migración efectivos. De hecho, los cladogramas obtenidos a partir del intergén de cpDNA y de los ITS sugieren que más de un evento de colonización debió ocurrir en la diversificación de *P. glandulosa* y *P. velutina*. Si el mecanismo hubiera sido por migración trans-trópico con estos resultados no es posible inferir el sentido en que dicha migración sucedió, aunque basado en el número de especies que habitan actualmente en cada subcontinente, Sudamérica podría ser el centro de origen de dichas especies.

De acuerdo a la tercera hipótesis planteada por Solbrig (1972) las especies de ambos subcontinentes podrían presentar las mismas variantes y frecuencias alélicas por convergencia evolutiva. De acuerdo con esto, asumiendo que las enzimas podrían ser selectivas, las variantes enzimáticas

evolucionarían de modo convergente dando lugar a los resultados observados. Sin embargo los resultados presentados por otros marcadores moleculares considerados neutros (como la secuencias de *TrnT-TrnD* e ITS) mostraron la misma tendencia que las isoenzimas en la cual se observa que todas las especies de *Algarobia* aquí estudiadas presentan niveles similares de divergencia genética independientemente de la ubicación geográfica. Además, los rasgos morfológicos, que pueden ser considerados selectivos, permiten la identificación inequívoca de estas especies, y si estuviéramos frente a un caso de convergencia, la diferenciación tendería a desaparecer con el tiempo y como propuso Solbrig (1972) podríamos confundir el escenario con aquel presentado por la migración a larga distancia.

En función de nuestros resultados ninguna de las tres hipótesis explican satisfactoriamente la distribución actual de las especies en ambos subcontinentes. Sin embargo, los datos obtenidos mediante el análisis fenético, cladístico y de genética poblacional aportan nueva información para establecer relaciones de similitud y parentesco así como de la estructura de las poblaciones naturales y todos estos resultados son importantes para comprender la evolución y dinámica de este grupo.

De esta manera, los estudios isoenzimáticos mostraron que *P. argentina*, *P. reptans* y *P. kuntzei* están bien diferenciadas de las restantes especies resultando alejadas en los fenogramas. En concordancia, los estudios cladísticos señalaron que *P. reptans* es, de las especies aquí estudiadas, la que divergió en tiempos mas tempranos. Sin embargo, la posición de *P. argentina* en los cladogramas debe ser considerada cuidadosamente siendo necesario analizar un número mayor de caracteres.

Dentro de *Algarobia*, *P. kuntzei* es la especie mas diferenciada a nivel isoenzimático y es la única que puede ser distinguida mediante los patrones de restricción (RFLP) utilizando como sonda cpDNA. Sin embargo esta tendencia no se refleja en las secuencias de *TrnT-TrnD* e ITS donde la divergencia de ésta se encuentra dentro del rango mostrado por las restantes especies. Ambos cladogramas la ubican en una posición basal señalando que esta especie ha divergido con anterioridad a las restantes especies de *Algarobia* incluidas en el presente trabajo.

Con respecto a las especies Norteamericanas estudiadas, los resultados isoenzimáticos señalaron que *P. glandulosa* (USA) presenta mayor similitud genética con las especies Sudamericanas estudiadas que con *P. velutina* (USA), además ni en el cladograma obtenido a partir del intergén *TrnT-TrnD* ni en el de los ITS ambas especies Norteamericanas resultaron asociadas sugiriendo para ellas diferentes orígenes.

En concordancia con trabajos previos, ni las relaciones cladísticas ni las fenéticas obtenidas en este trabajo reflejan la clasificación en series propuesta por Burkart (1976) en base a la morfología.

Los resultados isoenzimáticos señalaron a *P. vinalillo* asociada a *P. alba*, aunque ni los datos del intergén ni los de ITS apoyaron dicha relación. Por el contrario, cuando dicha asociación fue forzada sobre los cladogramas ambos resultaron significativamente menos parsimoniosos. *P. ruscifolia* resultó asociada a *P. vinalillo* en el cladograma basado en ITS.

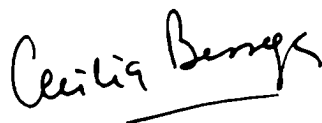
Además del enfoque evolutivo, el conocimiento de la estructura poblacional resulta sumamente interesante cuando la finalidad es la explotación racional de los algarrobos. La variabilidad genética en las especies Norteamericanas medida a través de isoenzimas y RAPD resultó similar a las estimas registrados por Ferreyra (2001) en especies Sudamericanas de *Algarobia* y en todos los casos las estimas fueron relativamente altas. Además, las especies de *Algarobia* muestran valores significativamente mayores de heterocigosis que los descriptos para *Monilicarpa* y *P. reptans*, la única especie estudiada de *Strombocarpa*. Sin embargo, *P. argentina* (*Monilicarpa*) muestra valores de variabilidad genética similares a los de *P. reptans* (*Strombocarpa*).

Los estudios isoenzimáticos permitieron analizar la estructura poblacional a través de los estadísticos F y en la mayor parte de las especies estudiadas de *Algarobia*, mostraron una tendencia general al exceso de homocigotas. Dicho exceso de homocigotas pudo ser explicado por la ocurrencia de endogamia y estructura poblacional. Las estimas de tasa de exogamia (fecundación cruzada) indicaron que alrededor del 15% de autofecundación puede ocurrir en las poblaciones aquí estudiadas y la similitud observada entre las estimas t_m y t_s sugirieron que no ocurre endogamia biparental. Además el análisis conjunto de las tasas de fecundación cruzada (t_m , t_s), la correlación de paternidad por exocruza (rp) y la correlación de t_m dentro de los grupos fraternos (rt) permitieron sugerir que la mayor parte de los individuos dentro de las progenies son hermanos completos y que existe variación en la tasa de fecundación cruzada entre plantas madres.

Los resultados presentados contribuyen a ampliar la información que se tiene acerca de los parámetros poblacionales y las complejas relaciones evolutivas entre las especies de *Prosopis* abriendo a la vez nuevos interrogantes que alientan a continuar con esta investigación. La incorporación de un número mayor de especies y de nuevos diseños experimentales permitirá profundizar aún mas el conocimiento de este género. De esta manera, toda la información podrá ser utilizada en un futuro para la explotación racional de este recurso y para el emprendimiento de planes de mejoramiento para características heredables de interés.



Dra. BEATRIZ O. SATORIAN
 Cs. BIOLÓGICAS (GENÉTICA)



Apéndices

Clasificación Del Género *Prosopis* Basada En Caracteres Morfológicos
(Burkart 1976)

***Prosopis* sect. PROSOPIS**

- 1 - *P. cineraria*
- 2 - *P. farcta*
- 3 - *P. koelziana*

***Prosopis* sect. ANONYCHIUM**

- 4 - *P. africana*

***Prosopis* sect. STROMBOCARPA**

Ser. Strombocarpae

- 5- *P. strombulifera* (var. *strombulifera*, var. *ruiziana*)
- 6- *P. reptans* (var. *reptans*, var. *cinerascens*)
- 7- *P. abbreviata*
- 8- *P. torquata*
- 9- *P. pubescens*
- 10- *P. palmeri*
- 11- *P. burkartii*

Ser. Cavenicarpae

- 12- *P. ferox*
- 13- *P. tamarugo*

***Prosopis* sect. MONILICARPA**

- 14- *P. argentina*

***Prosopis* sect. ALGAROBIA**

Ser. Sericanthae

- 15- *P. sericantha*
- 16- *P. kuntzei*

Ser. Ruscifoliae

- 17- *P. ruscifolia*
- 18- *P. fiebrigii*
- 19- *P. vinalillo*
- 20- *P. hassleri* (var. *hassleri*, var. *nigroides*)

Ser. Denudans

- 21- *P. denudans* (var. *denudans*, var. *patagonica*, var. *stenocarpa*)
- 22- *P. ruizleali*
- 23- *P. castellanosi*
- 24- *P. calingastana*

Ser. Humiles

- 25- *P. humilis*
- 26- *P. rojasiana*

Ser. Pallidae

- 27- *P. rubriflora*
- 28- *P. campestris*
- 29- *P. pallida*
- 30- *P. affinis*
- 31- *P. articulata*
- 32- *P. elata*
- 33- *P. tamaulipana*

Ser. Chilenses

- 34- *P. chilensis* (var. *chilensis*, var. *riojana*, var. *catamarcana*)
- 35- *P. juliflora* (var. *juliflora*, var. *inermis*, var. *horrida*)
- 36- *P. nigra* (var. *nigra*, var. *ragonesi*, var. *longispina*)
- 37- *P. caldenia*
- 38- *P. laevigata* (var. *laevigata*, var. *andicola*)
- 39- *P. flexuosa* (forma *subinermis*)
- 40- *P. glandulosa* (var. *glandulosa*, var. *torreyana*, var. *prostrata*)
- 41- *P. alpataco*
- 42- *P. alba* (var. *alba*, var. *panta*)
- 43- *P. velutina*
- 44- *P. pugionata*

A. Estimaciones De Variabilidad Genética

Número promedio de alelos por locus (A)

$$A = \frac{\text{Nº de alelos encontrados}}{\text{Total de loci analizados}}$$

Porcentaje de loci polimórfico (P)

$$P = \frac{\text{Nº de loci polimórficos}}{\text{Nº de loci analizados}}$$

En el presente trabajo un locus fue considerado polimórfico cuando la frecuencia del alelo mas común es igual o menor a 95%

Heterocigosis media esperada por locus (H)

Isoenzimas

$$H = 1/L \sum (1 - \sum p_{ij}^2)$$

L: Nº de loci analizados p_{ij} : frecuencia del alelo i-ésimo del locus j-ésimo

$$0 < H < 1$$

RAPD

$$H_j = 1/L \sum (H_j(i))$$

$$H_j(i) = 2pq = 2q_{j(i)}(1 - q_{j(i)})$$

p = frec. alelo marcador, q = frec. alelo nulo y $X = q^2$ X = frecuencia de individuos sin banda

B. Estimaciones De Indices De Fijación

Los índices de fijación pueden ser definidos en función de las diferencias observadas y esperadas de heterocigotas (Nei 1977)

F_{IT} Expresa las desviaciones de las subpoblaciones con respecto a la panmixia

$$F_{IT} = H_T - H_s / H_T$$

F_{IS} Mide el grado de endogamia dentro de cada población

$$F_{IS} = H_s - H_o / H_s$$

F_{ST} Mide divergencia entre poblaciones

$$F_{ST} = H_T - H_s / H_T$$

H_s : Heterocigosis esperada promedio por población; H_T : Heterocigosis esperada en la población total suponiendo apareamiento al azar y ausencia de subdivisión; H_o : Heterocigosis observada promedio

La relación entre los índices es: $(1 - F_{IT}) = (1 - F_{IS})(1 - F_{ST})$

La significación estadística de los valores de F_{IS} se calculó por el estadístico χ^2 de acuerdo a la fórmula de Li y Horvitz (1953): $\chi^2 = N F_{IS}^2 (k-1)$ donde N es el número total de individuos analizados y k: es el número de alelos en el locus.

C. Estimaciones De Sistema De Apareamiento

Para estimar los parámetros de sistema de apareamiento se utilizó el programa MLTR (Dr. Kermit Ritland, Department of Forest Sciences, University of British Columbia). Se utilizaron solamente aquellos loci que pudieron ser estudiados simultáneamente en el mismo individuo para calcular los siguientes parámetros:

- tm* Tasa de exogamia multilocus
- ts* Tasa de exogamia promedio para loci individuales
- rt* Correlación de *tm* dentro de los grupos fraternos
- rp* Correlación de paternidad por exocruza

El modelo de apareamiento mixto supone segregación independiente de los alelos de los diferentes loci. Se probó la falta de asociación entre los genotipos de los diferentes loci y se utilizó como evidencia la segregación independiente de los mismos que fue probada utilizando el programa GENEPOP (Raymond y Rousset, 1995). El método crea tablas de contingencia para todos los pares de loci en cada población y luego realiza un test de probabilidad (Test exacto de Fisher) para cada tabla utilizando una cadena de Markov. Las estimaciones de frecuencias alélicas para polen y óvulo se compararon por medio de tablas de contingencia utilizando el test Chi cuadrado de Pearson.

D. Sistemas Isoenzimáticos

Esterasas	EST	E.C.3.1.1
Peroxidas	PRX	E.C.1.11.1.7
Glutamato oxalacetato deshidrogenasa	GOT	E.C.2.6.1.1
Superóxidodismutasa	SOD	E.C.1.15.1.1
Isocitrato dehidrogenasa	IDH	E.C.1.1.1.42
Shikímico dehidrogenasa	SKD	E.C.1.1.1.25
6-fosfogluconicodehidrogenasa	6-PGD	E.C.1.1.1.43
Aminopeptidasas	AMP	E.C.3.4.1.2
Alcohol deshidrogenasa	ADH	E.C.1.1.1.1

E. Primers Utilizados

- B-01 5'-TCGAAGTCCT -3'
- B-07 5'-AGATGCAGCC -3'
- B-08 5'-TCACCACGGT -3'
- B-10 5'-CAGGCACTAG -3'

F. Ligamiento Entre Bandas.

El ligamiento entre loci RAPD fue estimado utilizando el programa RAPDLD del paquete RAPD (Black IV, 1996). Este programa utiliza el método propuesto por Otha (1982) donde la varianza total de desequilibrio de la muestra es dividida en dos componente. Los mismos miden la proporción de la varianza que ocurre dentro y entre poblaciones respectivamente. El primer componente (dentro) es una medida de la proporción de la varianza total de desequilibrio debida a epistasis, el segundo componente (entre) es una medida de la proporción de la varianza total que se debe a efecto Wahlund o deriva genética entre las poblaciones. La suma de estos componentes mide la varianza total de desequilibrio en la muestra total.

G. Estimación De Frecuencias Alélicas

Para los datos isoenzimáticos, se identificaron los posibles loci y alelos y se calcularon las frecuencias alélicas y genotípicas utilizando el programa BIOSYS 1.7 (Swofford y Selander, 1981). Las frecuencias alélicas en los loci con alelos nulos se calcularon a partir de la raíz cuadrada de la frecuencia de los genotipos homocigotas recesivos.

Para los datos RAPD, se construyó una matriz de presencia y ausencia de bandas que fue corrida con el programa RAPDBIOS del paquete RAPD (Black IV, 1996) que prepara el archivo de entrada para ser corrido en el BIOSYS 1.7. Las frecuencias alélicas fueron obtenidas asumiendo equilibrio Hardy-Weinberg para una especie diploide de reproducción sexual y se estimaron aplicando la corrección propuesta por Lynch y Milligan (1994).

H. Estimación Indirecta De Flujo Génico

Wright (1931) introdujo un modelo simple de estructura poblacional, llamado modelo de islas, que predice la relación entre el número de migrantes que una población recibe por generación y el F_{ST} . Bajo los supuestos de dicho modelo, el flujo génico (Nm) puede ser estimado a partir de la siguiente ecuación:

$$Nm \cong \frac{1 - F_{ST}}{4F_{ST}}$$

I. Significación De F_{ST}

El nivel de significación de los F_{ST} fue evaluado mediante el análisis de heterogeneidad a través de tablas de contingencia entre poblaciones tal como ha sido sugerido por Nei y Chesser (1983) utilizando el subprograma HETSQ del BIOSYS 1.7 (Swofford y Selander, 1981).

J. Test de Mantel

Las matrices de F_{ST} obtenidas por cada metodología fueron comparadas. Este análisis fue realizado mediante el Test de Mantel (1967) utilizando el subprograma ISOLDE del programa GENEPOP (Raymond y Rousset, 1995). El principio del test se basa en un remuestreo por el cual se permutan líneas o columnas de las matrices. El programa computacional utiliza para evaluar las correlaciones el método de "correlación de rangos sin aproximaciones". La hipótesis nula (H_0) es la independencia entre las dos matrices y la misma es rechazada cuando la proporción de permutaciones que generan una correlación mayor que la observada entre las matrices originales es menor a 0.05.

K. Análisis De Componentes De Varianza

Para comprobar si los niveles de variabilidad genética difieren significativamente entre poblaciones, especies y secciones se realizó un análisis de componentes de varianza utilizando el programa STATISTICA (StatSoft Inc. 1995). Para ello se transformaron los valores de heterocigosis de todos los loci isoenzimáticos estudiados como el arcoseno de la raíz de H y se normalizaron a varianza 1 y media 0.

L. Identidad y Distancia Genética (Nei 1972)

$$I_n = \frac{\sum_j \sum_i^L (p_{jix} \times p_{jiy})}{\sqrt{\sum_j \sum_i (p_{jix})^2 \sum_j \sum_i (p_{jiy})^2}}$$

L = N° de Loci, K = n° de alelos para un locus

p_{jix} y p_{jiy} = frecuencias alélicas del locus j en las poblaciones x e y .

$$D = -\ln I_n$$

M. Índices de Consistencia y de Retención (Farris 1989)

Una vez obtenido el árbol a partir de un "set" de datos es necesario describir el ajuste de los datos a los árboles obtenidos. Esto se hace a través de índices que expresan el grado de homoplasia requerida para explicar la variación observada. Los índices se calculan para cada carácter y para todos los caracteres de manera conjunta dando una idea global del ajuste de los datos al árbol. El índice global mas utilizado es el índice de consistencia (Kludge y Farris 1969). El mismo ha sido definido como $C = \sum m / \sum s$ donde m es el número mínimo de transiciones de estado que cada carácter puede mostrar en un árbol y s es el número de cambios requerido por cada carácter en el árbol que se

evalúa. Si los valores C van a ser comparados entre árboles, es conveniente excluir los caracteres no informativos ya que este índice suele verse influenciado. Otros índices muy utilizados son el índice de retención (R) y el índice de consistencia rescalado (RC) donde $R = \sum (g-s)/(g-m)$ (Farris 1989) siendo g el número máximo de transiciones que puede presentar cada carácter en un árbol. El índice de retención indica que proporción de las sinapomorfías aparentes pueden ser aceptadas como verdaderas sinapomorfías, es decir sin considerar aquellas que son atribuidas a la homoplasia. Valores de $r=1$ indican ausencia de homoplasia y $r=0$ indican que todas las sinapomorfías se deben a ocurrencia de homoplasia. RC puede ser estimado como el producto entre C y R .

N. Codificación De Indels

Todos los indels que tenían diferentes extremos 5' y/o 3' fueron codificados como caracteres que se adicionaron a la matriz de datos cuyos estados fueron presencia y ausencia siguiendo el método simple de codificación descrito por Simmons y Ochoterena (2000). Cuando un "gap" de una secuencia correspondía a una parte de otro indel mayor, el mismo fue considerado inaplicable y excluido de la matriz básica de datos (Apéndice 4 pag. 150).

Ñ. Test De Parsimonia Significativamente Menor (SLP_T)

Para estimar si los datos disponibles proveen un soporte significativamente menor para una topología alternativa en comparación con el árbol mas parsimonioso se utilizó el test de signos-rangos de dos colas de Wilcoxon (Wilcoxon *et al* 1970) como sugiere Templeton (1983). Las topologías alternativas fueron establecidas utilizando los comandos CONSTRAINTS y ENFORCE del programa PAUP (Swofford 1998) y mediante la búsqueda (Branch and Bound) se obtuvieron los árboles mas parsimoniosos para cada caso. El número de pasos requerido por cada árbol (en donde ciertos grupos eran forzados), fue comparado con el número de pasos del árbol mas parsimonioso en donde ningún grupo era establecido *a priori*.

La composición de las soluciones utilizadas se describen en la página 138.

A- Electroforesis De Isoenzimas

Se realizó a partir de cotiledones germinados siete días para todos los sistemas excepto para ADH que se utilizaron semillas remojadas por 24 hrs. aproximadamente. Se extrajeron las proteínas de los cotiledones al aplastar los mismos con Buffer de Extracción Isoenzimas en placas de toque. Se utilizaron papeles Whattman que fueron mojados en estos homogenatos y sembrados en geles al 5 ó 7% de acrilamida-bisacrilamida y corridos por 4 hrs. a 100 volts con diferentes Buffers para cada sistema. Cada uno de ellos fue teñido diferencialmente siguiendo descripciones previas (Saidman 1985, Bessega 1997, Julio 2000, Ferreyra 2001). Las recetas para cada sistema se resumen a continuación.

Receta para cada sistema isoenzimático

	Buffer gel (g.) - Buffer corrida (c.)	Tinción y revelado
EST	g. 0.06M Tris, 0.016M Acido cítrico c. 0.06M Tris, 0.016M Acido cítrico	0.03 gr Fast blue RR salt, 0.01 gr α y β -naftilacetato en Tris-HCl pH6 a 37°C por 1 hora en oscuridad.
PRX	g. 0.06M Tris, 0.016M Acido cítrico c. 0.06M Tris, 0.016M Acido cítrico	0.08 mg bencidina en 9 ml de ácido acético, 3 ml de agua oxigenada 0.02% y 30 ml de agua destilada por 10 minutos a temperatura ambiente.
SOD	g. 0.06M Tris, 0.016M Acido cítrico c. 0.06M Tris, 0.016M Acido cítrico	0.01 gr NBT, 0.01 gr NAD, 0.002 gr PMS, 0.02 gr EDTA en 50 ml Tris-HCL pH5.2 a la luz por 1 hora.
GOT	g. 9A:1B c. A A: 0.2M Ac. Bórico pH8.3, 0.05M Hidróxido de Litio B: 0.05M Tris. 0.008M Acido cítrico	0.001 gr Piridoxal fosfato, 0.226 gr ácido aspártico, 0.037 gr ácido cetoglutárico, 0.125 gr poli-vinil-pirrolidona en 50 ml de Buffer fosfato (0.2M) pH7.5 a 37° en oscuridad por una hora.
ADH	g. 0.13M Tris, 0.043M Acido cítrico c. 0.13M Tris, 0.043M Acido cítrico	0.001 gr PMS, 0.04 gr NBT, 0.05 gr NAD, 1 ml etanol 100%, 25 ml agua destilada, 4.5 ml Tris-HCl 0.5M pH7.1 por 20 minutos a 37°C en oscuridad.
IDH	g. 1 A : 2 agua destilada c. A A: 0.13M Tris, 0.043M Acido cítrico	0.01 gr NADP, 0.01 gr MTT, 0.01 gr PMS, 0.005 gr de Cl_2Mg , 0.03 gr ácido isocítrico en 30 ml de Tris-HCl 0.1M pH8 en oscuridad a 37°C por 1 hora.

Continúa.

	Buffer gel (g.) - Buffer corrida (c.)	Tinción y revelado
SKD	g. 1 A : 2 agua destilada c. A A: 0.13M Tris, 0.043M Acido cítrico	0.01 gr NADP, 0.01 gr MTT, 0.01 gr PMS, 0.005 gr de Cl_2Mg , 0.03 gr ácido shikímico en 30 ml de Tris-HCl 0.1M pH9 en oscuridad a 37°C por 1 hora.
6-PGD	g. 1 A : 2 agua destilada c. A A: 0.13M Tris, 0.043M Acido cítrico	0.01 gr NADP, 0.01 gr MTT, 0.01 gr PMS, 0.005 gr de Cl_2Mg , 0.03 gr ácido 6-fosfogluconico en 30 ml de Tris-HCl 0.1M pH8 en oscuridad a 37°C por 1 hora.
AMP	g. 9A:1B c. B A: 0.045M Tris, 0.013M Acido cítrico B: 0.22M Acido Bórico, 0.011M Hidróxido de Litio	0.03 gr Fast Black K salt, 0.05 gr Fast Garnet K salt en 50 ml de sol. ácido maleico (19.6gr/l) y 10 ml de sol. NaOH (12.8gr/l) + 0.07 gr de L - leucyl - β - naftilamida disuelta en metanol (10 ml). Revelar a 37°C en oscuridad por 2 horas.

B- Amplificación Al Azar De ADN Polimórfico (RAPD)

Una vez extraído el ADN (parte C de este mismo Apéndice) el mismo fue cuantificado en gel de agarosa al 0.8%. La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 50 μ l. La mezcla de reacción contenía: 30-80 ng de ADN, 100mM de cada dNTP, 60 ng de "primer" arbitrario (PROMEGA), Buffer 1X de Taq-polimerasa, 2mM de Cl_2Mg y 0.5 u de Taq-polimerasa. La mezcla de reacción se la colocó en termociclador Techne-Genex programado del siguiente modo: un ciclo de 1 min a 94°C, 40 ciclos de 1 min a 92°C, 2 min a 36°C, 2 min a 72°C y un ciclo de extensión final de 6 min a 72°C. Los productos de PCR fueron visualizados luego de la correspondiente electroforesis en gel de agarosa al 1.4% y tinción con bromuro de etidio en transiluminador UV.

C- Extracción De ADN

El protocolo utilizado es una modificación del descripto por Dellaporta *et al* (1983).

- 1-Moler los cotiledones en mortero utilizando aire líquido
- 2-Pasar el material molido a un tubo ependorf
- 3-Colocar 500 μ l de Buffer de Extracción A y 35 μ l de SDS 20%
- 4-Incubar a 55°C durante 10 minutos
- 5-Agregar 175 μ l de Acetato de K 5M pH 5.2 y mezclar por inversión
- 6-Incubar en hielo durante 20 minutos
- 7-Centrifugar durante 10 minutos a 13000 rpm.
- 8-Tomar el sobrenadante y agregar 500 μ l de fenol: cloroformo:isoamílico (25:24:1)
- 9-Centrifugar 5 minutos a 13000 rpm.

- 10-Tomar la fase superior y colocarla en nuevos tubos.
- 11-Agregar 50 µl de Acetato de Na 5M pH 5.2 y 1000 µl de etanol 100%
- 12-Incubar toda la noche a -20°C
- 13-Centrifugar 10 minutos a 13000 rpm.
- 14-Lavar con etanol 70% y dejar secar
- 15-Resuspender en 100 ml de agua destilada estéril
- 16-Agregar 10ml de ARNasa e incubar 1 hora a 37°C
- 17-Conservar las muestras a -20°C hasta el momento de su utilización

D- Polimorfismo Para El Largo De Los Fragmentos De Restricción (RFLP)

Transformación con los clones de ADN de cloroplasto de *Nicotiana tabacum*

Se disponía de 40 plásmidos que contenían insertos de diferentes tamaños cubriendo la totalidad del cloroplasto de *Nicotiana tabacum* que fueron donados gentilmente por Dr. J. J. Doyle (Cornell University, Ithaca, USA). Para este estudio se eligieron 6 clones que representan alrededor del 17.5-23% del cloroplasto e incluye una porción de la copia única menor (SSC) y una porción de la región repetida invertida (IR) llamadas sonda A y B respectivamente (pag. 81).

Las células competentes JM109 (PROMEGA) fueron transformadas por tratamiento térmico de acuerdo al siguiente protocolo (Maniatis *et al*/1982).

- 1-Incubar las células en hielo durante 30 minutos. Agregar 10 a 200 ng de DNA.
- 2-Pasarlas rápidamente a un baño térmico a 42° durante dos minutos y luego a hielo durante un minuto.
- 3-Añadir 2 ml de LB y agitar durante 1 hr. a 37°C
- 4-Plaques las células en placas con LB y antibiótico (Ampicilina) y dejar toda la noche a 37°C.
- 5-Dado que el plásmido posee el gen de resistencia a Ampicilina, solo crecerán aquellas bacterias que contengan el plásmido y por como consecuencia el inserto.

Extracción de ADN plasmídico

- 1-Repicar las colonias crecidas en las placas y ponerlas a crecer en medio líquido (10 ml) a 37°C toda la noche.
- 2-Centrifugar el medio líquido con las bacterias crecidas en dos tubos ependorf hasta completar el volumen total.
- 3-Resuspender en 200ml de Solución I y una punta de espátula de lisozima.
- 4-Incubar 10 minutos a temperatura ambiente
- 5-Agregar 400ml de solución II.

- 6-Incubar 5 minutos en hielo.
- 7-Agregar 300 ml de solución III y agitar por inversión
- 8- Centrifugar 15 minutos a 13000 rpm
- 9-Tomar 800 ml de sobrenadante en un nuevo tubo y agregar 600 ml de isopropanol
- 10- Centrifugar 15 minutos a 13000rpm
- 11-Lavar con etanol 80%, dejar secar y resuspender en TE
- 12-Tratar con RNAsa
- 13-Extraer el ADN plasmídico una vez con fenol y otra con fenol-cloroformo:isoamílico (25:24:1)
- 14-Precipitar el ADN con solución III y dos volúmenes de etanol 100%
- 15-Incubar a -20°C durante 30 minutos
- 16- Centrifugar 15 minutos a 13000rpm
- 17- Lavar con etanol 80%, dejar secar y resuspender en agua destilada estéril.

Marcación no radioactiva de la sonda

Previamente a la marcación de la sonda, se digirieron los plásmidos con las enzimas de restricción que correspondían en cada caso y se corrieron en gel de agarosa al 0.8%. Se purificaron los fragmentos de interés utilizando kit QUIAQUICK gel siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para la marcación se utilizó kit "DIG DNA labelling" (Boheringer Mannheim) que incorpora los nucleótidos marcados con digoxigenina mediante el método "random priming" utilizando "primers" al azar para unirse al ADN molde. La enzima que incorpora la marca es la ADN polimerasa Klenow.

La mezcla de reacción contiene:

Entre 10 ng y 3 μg de ADN desnaturalizado a 100°C por 10 minutos, 2 μl de mezcla de hexanucleótidos (10X), 2 μl de dNTP marcados (10X), 2 μl de Buffer de enzima (10X), 1 μl de enzima Klenow y cantidad suficiente de agua destilada estéril para un volumen final de 20 μl .

La mezcla de reacción es incubada a 37°C durante toda la noche y guardada a -20°C hasta el momento de su utilización.

Digestión con enzimas de restricción

Se utilizaron 10 enzimas de restricción (PROMEGA) que reconocen secuencias de cuatro y seis pares de bases. Para la digestión se colocó: 30 μl de ADN genómico (entre 500 ng y 1 μg), 5 μl de Buffer de enzima (10X), 5 μl de suero de albúmina bovina (10 mg/ml), 1 μl de enzima (1U/ μl), 9 μl de agua destilada estéril. La reacción se lleva a cabo a 37°C durante toda la noche.

Corrida en geles de agarosa del ADN previamente digerido

El ADN digerido se corrió en geles de agarosa entre el 0.7 y 1.4% en Buffer TAE 1X pH 8 durante seis horas. En todos los casos se sembró fago lambda digerido con Hind III y EcoRI (PROMEGA) como marcador de peso molecular.

Transferencia

Al ADN genómico digerido fue transferido a membranas de nylon (GeneScreen) de acuerdo al método de Southern (1975).

- 1-Colocar el gel en solución desnaturizante durante 45 minutos a temperatura ambiente con agitación
- 2-Descartar la solución desnaturizante y agregar solución neutralizante durante 20 minutos
- 3-Descartar la solución neutralizante y agregar nueva solución durante 20 minutos más.
- 4-Preparar el sistema de transferencia colocando un soporte de acrílico con papel Whattman 2MM en contacto con solución 10X SSC.
- 5-Colocar el gel sobre el papel Whattman de modo que no queden burbujas.
- 6-Colocar sobre el gel la membrana de nylon previamente humedecida en solución neutralizante de modo que no queden burbujas.
- 7-Colocar sobre la membrana dos papeles Whattman y un taco de papel absorbente seco de 3 cm de alto y un peso de aproximadamente un kilo.
- 8-Dejar durante toda la noche para que ocurra la transferencia
- 9-Desmontar el sistema y humedecer la membrana en solución 2X SSC
- 10-Dejar secar la membrana y fijar el ADN en transiluminador UV durante 2 minutos.

Hibridación y detección

La hibridación se realizó siguiendo el protocolo descrito en Maniatis *et al* (1982).

- 1-Introducir la membrana en un tubo de hibridación y colocar 20 ml de solución de pre-hibridación.
- 2-Incubar durante 2 hrs. a 55°C
- 3-Reemplazar la solución de pre-hibridación por solución de hibridación que contiene la sonda (5 a 25 ng /ml) previamente desnaturizada.
- 4- Incubar toda la noche a 55°C
- 5-Realizar lavados de 15 minutos cada uno a la misma temperatura con las soluciones a (2X SSC, 0.1% SDS), b (1X SSC, 0.1% SDS) y c (0.5X SSC, 0.1 % SDS).
- 6-Enjuagar la membrana con Buffer I e incubarla durante media hora con Buffer II a temperatura ambiente.

7-Lavar con Buffer I e incubar con solución de anticuerpo anti-DIG (Boheringer Mannheim) durante media hora a temperatura ambiente con agitación.

8- Descartar solución de anticuerpo y realizar dos lavados de media hora con Buffer I a temperatura ambiente.

Añadir 20 ml de solución de color (Boheringer Mannheim) y conservar hasta la visualización de las bandas.

E-Amplificación De Fragmentos De ADN Específicos Para Su Posterior Secuenciación.

La PCR se realizó en un volumen final de 50 μ l y la mezcla de reacción contenía 10 ng de ADN molde, 0.25 μ M de cada "primer", 1 μ l de un stock 10 mM de cada dNTP, 1mM (4 μ l de 25 mM) Cl_2Mg , 5 μ l de Buffer de Taq-polimerasa (10X) y 0.25 u de Taq-polimerasa (Promega). A continuación se presentan los "primers" universales utilizados para amplificar el intergén *TrnT-TrnD* y los espaciadores internos transcritos del ADN ribosómico (ITS-1 e ITS-2). Para estudiar ambos ITS se amplificó una única región que incluía el ITS-1, el gen ribosómico 5.8S y el ITS-2. El "primer" Q1 se une a la región 3' del gen ribosómico 18S y Q2 al extremo 5' del gen 26S.

Región	Primers	Referencia
<i>TrnT - TrnD</i>	TrnT 5' ACC AAT TGA ACT ACA ATC CC 3' TrnD 5' CTA CCA CTG AGT TAA AAG GG 3'	Demesure <i>et al</i> (1995)
ITS-1 e ITS-2	Q1 5' GAA CCT GCG GAA GGA TCA TTG 3' Q2 5' CGG GTA GTT CCC GCC TGA CCT G 3'	Samuel <i>et al</i> (1998)

La reacción se realizó en un termociclador Techne-Genex programado del siguiente modo: 1 ciclo para desnaturalizar el ADN de 6 minutos a 94°C, 35 ciclos de 30 segundos a 94°C; 1 minuto a 54°C para el intergén ó 50°C para los ITS y 2 minutos a 72°C. Por último un ciclo final de extensión de 10 minutos a 72°C

Corrida en gel, obtención del fragmento, purificación y secuenciación.

Las amplificaciones fueron chequeadas en geles de agarosa al 1% y los productos de PCR fueron purificados con el kit QUIAQUICK gel clean. Se realizaron varias repeticiones de la misma amplificación de modo de poder concentrar la muestra de interés para su posterior secuenciación. Los productos de PCR fueron secuenciados utilizando protocolos standards de secuenciación (dye terminator/dye primer) utilizando secuenciador automático

PE BioSystems 377 por la empresa ANA-GEN Technologies, Inc. (Palo Alto, CA, USA; <http://www.ana-gen.com>)

Composición de las soluciones utilizadas

Solución	Composición
Buffer extracción Isoenzimas	Tris-HCl 0.1M pH 7.1
Buffer extracción ADN	50 ml Tris 1M pH 8, 100 ml EDTA 0.25M pH 8 y 14.61 gr NaCl para 500 ml
Rnasa	10mg/ml de agua destilada
TE	10mM Tris-HCL pH 8 y 1mM EDTA
LB	10 gr. Bactotripton, 5 gr. Extracto de levadura y 10 gr. de NaCl por litro de solución pH 7
Ampicilina	50mg/ml de agua destilada
Solución I	5mM glucosa, 25 mM Tris-HCl pH 8 y 10mM EDTA
Solución II	0.2N NaOH y 1% SDS
Solución III	Acetato de Na 3M pH 5.2
TAE 50X	242 gr Tris, 57.1 ml ácido acético y 200 ml EDTA 0.25M pH 8 por litro
20X SSC	3M de NaCl y 300mM citrato de sodio pH 7
Sol Desnaturalizante	0.5N NaOH, 1.5M NaCl
Sol Neutralizante	0.5M Tris-HCl pH 7.5, 3M NaCl
Sol pre-hibridación	0.5% agente bloqueante, 5X SSC, 0.1% L-lauroyl-sarcosina, 0.02 % SDS
Buffer I	100mM Tris-HCl pH7.5, 150 mM NaCl
Buffer II	0.5% de agente bloqueante en Buffer I
Buffer III	100mM Tris-HCl pH 9.5, 100mM NaCl, 50mM Cl ₂ Mg
Solución anticuerpo	4ml de anticuerpo anti-dig en 20 ml de Buffer I
Solución color	90ml NBT (75mg/ml), 70 ml X-fosfato (50mg/ml) en 20ml de Buffer III

A-Frecuencias Alélicas En Las Poblaciones Estudiadas (Isoenzimas).

	(N)	<i>Adh-1</i>					(N)	<i>Adh-2</i>		
		130	128	124	133	129		220	217	214
<i>P.ruHe</i>	68	1.000	.000	.000	.000	.000	68	.000	1.000	.000
<i>P.ruSA</i>	53	1.000	.000	.000	.000	.000	53	.009	.991	.000
<i>P.ruRi</i>	62	1.000	.000	.000	.000	.000	61	.057	.926	.016
<i>P.ruPi</i>	41	.927	.073	.000	.000	.000	41	.000	1.000	.000
<i>p.alCH</i>	40	.000	1.000	.000	.000	.000	40	.000	1.000	.000
<i>P.alTR</i>	25	.000	1.000	.000	.000	.000	25	.000	1.000	.000
<i>P.alLM</i>	90	.000	1.000	.000	.000	.000	90	.000	1.000	.000
<i>P.alSU</i>	81	.000	1.000	.000	.000	.000	81	.000	1.000	.000
<i>P.alIC</i>	65	.015	.985	.000	.000	.000	66	.000	1.000	.000
<i>P.alBU</i>	60	.000	1.000	.000	.000	.000	62	.000	1.000	.000
<i>P.alCU</i>	62	.000	1.000	.000	.000	.000	62	.000	1.000	.000
<i>P.chiPA</i>	50	.120	.880	.000	.000	.000	50	.000	1.000	.000
<i>P.chiBE</i>	40	.038	.050	.438	.475	.000	40	.000	.938	.063
<i>P.chiTA</i>	59	.136	.864	.000	.000	.000	59	.000	1.000	.000
<i>P.chiLH</i>	49	.041	.755	.204	.000	.000	42	.976	.024	.000
<i>P.niHC</i>	108	.579	.412	.009	.000	.000	100	.000	1.000	.000
<i>P.niLM</i>	42	.310	.690	.000	.000	.000	28	.000	1.000	.000
<i>P.flLA</i>	100	.640	.250	.110	.000	.000	100	.000	1.000	.000
<i>P.flQU</i>	49	.490	.388	.122	.000	.000	49	.000	1.000	.000
<i>P.vi7A</i>	65	.685	.315	.000	.000	.000	65	.000	1.000	.000
<i>P.glWE</i>	39	.936	.064	.000	.000	.000	39	.000	1.000	.000
<i>P.glLC</i>	40	.950	.050	.000	.000	.000	40	.000	1.000	.000
<i>P.glBC</i>	40	.950	.050	.000	.000	.000	40	.000	1.000	.000
<i>P.glFC</i>	30	1.000	.000	.000	.000	.000	30	.000	1.000	.000
<i>P.veSR</i>	41	.780	.220	.000	.000	.000	42	.000	1.000	.000
<i>P.kuTA</i>	39	.000	1.000	.000	.000	.000	39	1.000	.000	.000
<i>P.arTI</i>	64	.000	.000	.000	.000	1.000	64	1.000	.000	.000
<i>P.arTU</i>	64	.000	.000	.000	.000	1.000	64	1.000	.000	.000
<i>P.re HE</i>	50	.000	.000	.000	.000	1.000	50	.000	.000	1.000

Skd-1		124	122	119	117
	(N)				
<i>P.ruHe</i>	66	.152	.848	.000	.000
<i>P.ruSA</i>	55	.073	.927	.000	.000
<i>P.ruRi</i>	59	.076	.924	.000	.000
<i>P.ruPi</i>	102	.142	.284	.574	.000
<i>p.alCH</i>	50	.060	.940	.000	.000
<i>P.alTR</i>	34	.118	.868	.015	.000
<i>P.alLM</i>	49	.214	.786	.000	.000
<i>P.alSU</i>	70	.314	.643	.043	.000
<i>P.alIC</i>	47	.245	.755	.000	.000
<i>P.alBU</i>	66	.144	.561	.295	.000
<i>P.alCU</i>	98	.107	.852	.041	.000
<i>P.chiPA</i>	16	.750	.031	.219	.000
<i>P.chiBE</i>	28	.393	.286	.321	.000
<i>P.chiTA</i>	24	.729	.229	.042	.000
<i>P.chiLH</i>	34	.838	.103	.059	.000
<i>P.niHC</i>	61	.352	.549	.098	.000
<i>P.niLM</i>	48	.729	.240	.031	.000
<i>P.flLA</i>	48	.333	.594	.073	.000
<i>P.flQU</i>	46	.000	.587	.207	.207
<i>P.vi7A</i>	72	.069	.868	.063	.000
<i>P.glWE</i>	43	.093	.651	.256	.000
<i>P.glLC</i>	42	.190	.429	.381	.000
<i>P.glBC</i>	44	.250	.659	.091	.000
<i>P.glFC</i>	36	.167	.750	.083	.000
<i>P.veSR</i>	32	.531	.469	.000	.000
<i>P.kuTA</i>	50	.000	1.000	.000	.000
<i>P.arTI</i>	47	.000	.287	.521	.191
<i>P.arTU</i>	47	.000	.160	.649	.191
<i>P. re HE</i>	40	.000	1.000	.000	.000

IdH-1		175	170	163	160	186	184	182	180
	(N)								
<i>P.ruHe</i>	63	.000	.421	.579	.000	.000	.000	.000	.000
<i>P.ruSA</i>	22	.000	.568	.432	.000	.000	.000	.000	.000
<i>P.ruRi</i>	55	.000	.391	.609	.000	.000	.000	.000	.000
<i>P.ruPi</i>	97	.000	.619	.366	.015	.000	.000	.000	.000
<i>p.alCH</i>	45	1.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000
<i>P.alTR</i>	40	1.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000
<i>P.alLM</i>	34	1.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000
<i>P.alSU</i>	57	1.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000
<i>P.alIC</i>	65	1.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000
<i>P.alBU</i>	70	.093	.886	.021	.000	.000	.000	.000	.000
<i>P.alCU</i>	108	1.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000
<i>P.chiPA</i>	31	.258	.677	.065	.000	.000	.000	.000	.000
<i>P.chiBE</i>	47	.468	.404	.128	.000	.000	.000	.000	.000
<i>P.chiTA</i>	25	.960	.040	.000	.000	.000	.000	.000	.000
<i>P.chiLH</i>	46	.772	.228	.000	.000	.000	.000	.000	.000
<i>P.niHC</i>	85	.012	.176	.782	.029	.000	.000	.000	.000
<i>P.niLM</i>	37	.000	.257	.743	.000	.000	.000	.000	.000
<i>P.flLA</i>	40	.063	.100	.813	.025	.000	.000	.000	.000
<i>P.flQU</i>	95	.005	.116	.858	.021	.000	.000	.000	.000
<i>P.vi7A</i>	89	.264	.652	.084	.000	.000	.000	.000	.000
<i>P.glWE</i>	56	.054	.920	.027	.000	.000	.000	.000	.000
<i>P.glLC</i>	47	.043	.628	.330	.000	.000	.000	.000	.000
<i>P.gIBC</i>	43	.384	.593	.023	.000	.000	.000	.000	.000
<i>P.gIFC</i>	45	.211	.611	.178	.000	.000	.000	.000	.000
<i>P.veSR</i>	42	.833	.167	.000	.000	.000	.000	.000	.000
<i>P.kuTA</i>	50	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	1.000
<i>P.arTI</i>	47	.000	.000	1.000	.000	.000	.000	.000	.000
<i>P.arTU</i>	47	.000	.000	1.000	.000	.000	.000	.000	.000
<i>P. re HE</i>	29	.000	.000	.000	.000	.224	.448	.328	.000

IdH-2		243	240	226	245
	(N)				
<i>P.ruHe</i>	63	.000	.000	1.000	.000
<i>P.ruSA</i>	22	.000	.000	1.000	.000
<i>P.ruRi</i>	55	.000	.000	1.000	.000
<i>P.ruPi</i>	97	.000	.000	1.000	.000
<i>p.alCH</i>	45	1.000	.000	.000	.000
<i>P.alTR</i>	36	1.000	.000	.000	.000
<i>P.alLM</i>	34	1.000	.000	.000	.000
<i>P.alSU</i>	57	1.000	.000	.000	.000
<i>P.alIC</i>	65	1.000	.000	.000	.000
<i>P.alBU</i>	70	1.000	.000	.000	.000
<i>P.alCU</i>	108	.861	.139	.000	.000
<i>P.chiPA</i>	34	.000	.632	.368	.000
<i>P.chiBE</i>	23	.087	.761	.152	.000
<i>P.chiTA</i>	46	.000	.663	.337	.000
<i>P.chiLH</i>	34	.000	.632	.368	.000
<i>P.niHC</i>	60	.000	.000	1.000	.000
<i>P.niLM</i>	37	.000	.000	1.000	.000
<i>P.flLA</i>	40	1.000	.000	.000	.000
<i>P.flQU</i>	98	1.000	.000	.000	.000
<i>P.vi7A</i>	60	1.000	.000	.000	.000
<i>P.glWE</i>	56	.000	.000	1.000	.000
<i>P.glLC</i>	36	.000	.000	1.000	.000
<i>P.gIBC</i>	44	.000	.000	1.000	.000
<i>P.gIFC</i>	46	.000	.000	1.000	.000
<i>P.veSR</i>	42	.000	.000	1.000	.000
<i>P.kuTA</i>	50	.000	.000	1.000	.000
<i>P.arTI</i>	47	1.000	.000	.000	.000
<i>P.arTU</i>	47	1.000	.000	.000	.000
<i>P. re HE</i>	29	.000	.000	.000	1.000

	Est-1					Est-2			Est-3			Est-4		
	(N)	193	192	191	190	(N)	287	20	(N)	385	30	(N)	481	40
<i>P.ruHe</i>	77	.013	.734	.253	.000	71	.655	.345	75	.493	.507	76	.237	.763
<i>P.ruSA</i>	68	.000	.890	.110	.000	69	.609	.391	69	.790	.210	73	.301	.699
<i>P.ruRi</i>	44	.000	.886	.114	.000	48	.313	.688	49	.867	.133	49	.592	.408
<i>P.ruPi</i>	69	.000	.928	.072	.000	89	.876	.124	89	.697	.303	89	.090	.910
<i>p.alCH</i>	40	.000	.925	.075	.000	35	.700	.300	32	.172	.828	22	.477	.523
<i>P.alTR</i>	40	.063	.887	.050	.000	38	.434	.566	38	.342	.658	38	.395	.605
<i>P.alLM</i>	45	.000	.711	.289	.000	45	.644	.356	45	.644	.156	45	.433	.567
<i>P.alSU</i>	54	.000	.870	.130	.000	49	.592	.408	39	.833	.167	49	.214	.786
<i>P.alIC</i>	55	.000	.891	.109	.000	54	.481	.519	53	.717	.283	53	.472	.528
<i>P.alBU</i>	90	.000	.889	.111	.000	79	.696	.304	67	.343	.657	72	.250	.750
<i>P.alCU</i>	90	.000	.978	.022	.000	90	.694	.306	90	.817	.183	90	.278	.722
<i>P.chiPA</i>	56	.000	.125	.634	.241	57	.482	.518	57	.605	.395	56	.259	.741
<i>P.chiBE</i>	78	.000	.096	.795	.109	95	.326	.674	95	.447	.553	99	.348	.652
<i>P.chiTA</i>	70	.000	.507	.493	.000	57	.711	.289	57	.737	.263	54	.306	.694
<i>P.chiLH</i>	62	.403	.516	.081	.000	31	.516	.484	31	.516	.484	31	.677	.323
<i>P.niHC</i>	76	.289	.579	.132	.000	65	.615	.385	65	.562	.438	65	.615	.385
<i>P.niLM</i>	57	.009	.728	.263	.000	55	.445	.555	54	.694	.306	53	.387	.613
<i>P.flLA</i>	96	.167	.516	.318	.000	82	.909	.091	87	1.000	.000	87	.879	.121
<i>P.flQU</i>	84	.000	.833	.161	.006	49	.776	.224	49	.776	.224	50	.500	.500
<i>P.vi7A</i>	52	.000	.760	.212	.029	55	.518	.482	54	.491	.509	56	.196	.804
<i>P.glWE</i>	64	.094	.469	.438	.000	32	.750	.250	32	.391	.609	31	.177	.823
<i>P.glLC</i>	30	.067	.800	.133	.000	34	.750	.250	34	.162	.838	34	.029	.971
<i>P.glBC</i>	76	.000	.263	.737	.000	38	1.000	.000	48	.427	.573	38	.026	.974
<i>P.glFC</i>	43	.500	.349	.012	.140	52	.673	.327	52	.433	.567	52	.135	.865
<i>P.veSR</i>	31	.097	.742	.161	.000	38	.355	.645	38	.237	.763	38	.487	.513
<i>P.kuTA</i>	50	.000	1.000	.000	.000	47	.000	1.000	47	.000	1.000	47	.000	1.000
<i>P.arTI</i>	32	—	—	—	—	32	—	—	32	—	—	32	—	—
<i>P.arTU</i>	32	—	—	—	—	32	—	—	32	—	—	32	—	—
<i>P. re HE</i>	50	—	—	—	—	50	—	—	50	—	—	50	—	—

	Est-6		Est-7		Est-8		Est-9		Est-10	
	(N)	690	(N)	786	(N)	882	(N)	978	(N)	1057
<i>P.ruHe</i>	77	—	77	—	77	—	77	—	77	—
<i>P.ruSA</i>	68	—	68	—	68	—	68	—	68	—
<i>P.ruRi</i>	44	—	44	—	44	—	44	—	44	—
<i>P.ruPi</i>	72	—	72	—	72	—	72	—	72	—
<i>p.alCH</i>	40	—	40	—	40	—	40	—	40	—
<i>P.alTR</i>	40	—	40	—	40	—	40	—	40	—
<i>P.alLM</i>	45	—	45	—	45	—	45	—	45	—
<i>P.alSU</i>	54	—	54	—	54	—	54	—	54	—
<i>P.alIC</i>	55	—	55	—	55	—	55	—	55	—
<i>P.alBU</i>	90	—	90	—	90	—	90	—	90	—
<i>P.alCU</i>	88	—	88	—	88	—	88	—	88	—
<i>P.chiPA</i>	56	—	56	—	56	—	56	—	56	—
<i>P.chiBE</i>	78	—	78	—	78	—	78	—	78	—
<i>P.chiTA</i>	70	—	70	—	70	—	70	—	70	—
<i>P.chiLH</i>	62	—	62	—	62	—	62	—	62	—
<i>P.niHC</i>	76	—	76	—	76	—	76	—	76	—
<i>P.niLM</i>	57	—	57	—	57	—	57	—	57	—
<i>P.flLA</i>	96	—	96	—	96	—	96	—	96	—
<i>P.flQU</i>	84	—	84	—	84	—	84	—	84	—
<i>P.vi7A</i>	52	—	52	—	52	—	52	—	52	—
<i>P.glWE</i>	64	—	64	—	64	—	64	—	64	—
<i>P.glLC</i>	56	—	56	—	56	—	56	—	56	—
<i>P.glBC</i>	76	—	76	—	76	—	76	—	76	—
<i>P.glFC</i>	43	—	43	—	43	—	43	—	43	—
<i>P.veSR</i>	31	—	31	—	31	—	31	—	31	—
<i>P.kuTA</i>	50	—	50	—	50	—	50	—	50	—
<i>P.arTI</i>	32	—	32	—	32	—	32	—	32	—
<i>P.arTU</i>	32	—	32	—	32	—	32	—	32	—
<i>P. re HE</i>	50	1.000	50	1.000	50	1.000	50	1.000	50	1.000

	Est-11		Est-12		Est-13		Est-14			
	(N)	1146	(N)	1240	(N)	1330	(N)	1420		
<i>P.ruHe</i>	77	—	77	—	77	—	77	—		
<i>P.ruSA</i>	68	—	68	—	68	—	68	—		
<i>P.ruRi</i>	44	—	44	—	44	—	44	—		
<i>P.ruPi</i>	72	—	72	—	72	—	72	—		
<i>p.alCH</i>	40	—	40	—	40	—	40	—		
<i>P.alTR</i>	40	—	40	—	40	—	40	—		
<i>P.alLM</i>	45	—	45	—	45	—	45	—		
<i>P.alSU</i>	54	—	54	—	54	—	54	—		
<i>P.alIC</i>	55	—	55	—	55	—	55	—		
<i>P.alBU</i>	80	—	80	—	90	—	90	—		
<i>P.alCU</i>	88	—	88	—	88	—	88	—		
<i>P.chiPA</i>	56	—	56	—	56	—	56	—		
<i>P.chiBE</i>	78	—	78	—	78	—	78	—		
<i>P.chiTA</i>	70	—	70	—	70	—	70	—		
<i>P.chiLH</i>	62	—	62	—	62	—	62	—		
<i>P.niHC</i>	76	—	76	—	76	—	76	—		
<i>P.niLM</i>	57	—	57	—	57	—	57	—		
<i>P.flLA</i>	96	—	96	—	96	—	96	—		
<i>P.flQU</i>	84	—	84	—	84	—	84	—		
<i>P.vi7A</i>	52	—	52	—	52	—	52	—		
<i>P.glWE</i>	64	—	64	—	64	—	64	—		
<i>P.glLC</i>	56	—	56	—	56	—	56	—		
<i>P.glBC</i>	76	—	76	—	76	—	76	—		
<i>P.glFC</i>	43	—	43	—	43	—	43	—		
<i>P.veSR</i>	31	—	31	—	31	—	31	—		
<i>P.kuTA</i>	50	—	50	—	50	—	50	—		
<i>P.arTI</i>	32	1.000	32	1.000	32	1.000	32	1.000		
<i>P.arTU</i>	32	1.000	32	1.000	32	1.000	32	1.000		
<i>P. re HE</i>	50	—	50	—	50	—	50	—		
	Amp-1		Amp-2		Amp-3					
	(N)	1100	(N)	288	276	270	(N)	377	374	371
<i>P.ruHe</i>	41	1.000	41	.476	.402	.122	41	—	—	—
<i>P.ruSA</i>	95	1.000	95	.247	.521	.232	95	—	—	—
<i>P.ruRi</i>	62	1.000	62	.387	.411	.202	62	—	—	—
<i>P.ruPi</i>	29	1.000	29	.328	.552	.121	29	—	—	—
<i>p.alCH</i>	19	1.000	19	.421	.579	.000	19	—	—	—
<i>P.alTR</i>	60	1.000	6	.250	.750	.000	6	—	—	—
<i>P.alLM</i>	61	1.000	61	.410	.475	.115	61	—	—	—
<i>P.alSU</i>	37	1.000	37	.270	.554	.176	37	—	—	—
<i>P.alIC</i>	61	1.000	61	.238	.582	.180	61	—	—	—
<i>P.alBU</i>	48	1.000	48	.406	.594	.000	48	—	—	—
<i>P.alCU</i>	28	1.000	28	.232	.268	.500	28	—	—	—
<i>P.chiPA</i>	84	1.000	84	.256	.565	.179	84	—	—	—
<i>P.chiBE</i>	54	1.000	54	.324	.398	.278	54	—	—	—
<i>P.chiTA</i>	43	1.000	43	.209	.570	.221	43	—	—	—
<i>P.chiLH</i>	132	1.000	132	.379	.413	.208	132	—	—	—
<i>P.niHC</i>	51	1.000	51	.127	.461	.412	51	—	—	—
<i>P.niLM</i>	40	1.000	40	.138	.587	.275	40	—	—	—
<i>P.flLA</i>	105	1.000	105	.248	.571	.181	105	—	—	—
<i>P.flQU</i>	44	1.000	44	.455	.545	.000	44	—	—	—
<i>P.vi7A</i>	52	1.000	62	.387	.411	.202	52	—	—	—
<i>P.glWE</i>	30	1.000	30	.417	.467	.117	30	—	—	—
<i>P.glLC</i>	37	1.000	37	.405	.392	.203	37	—	—	—
<i>P.glBC</i>	44	1.000	44	.250	.455	.295	44	—	—	—
<i>P.glFC</i>	42	1.000	42	.381	.548	.071	42	—	—	—
<i>P.veSR</i>	34	1.000	34	.794	.206	.000	34	—	—	—
<i>P.kuTA</i>	30	1.000	30	.000	.717	.283	30	—	—	—
<i>P.arTI</i>	16	1.000	16	1.000	.000	.000	11	.000	.273	.727
<i>P.arTU</i>	16	1.000	16	1.000	.000	.000	14	.071	.714	.214
<i>P. re HE</i>	80	1.000	80	1.000	.000	.000	80	.237	.000	.762

	Sod-1		Sod-2		Sod-3		Sod-4		Sod-5		Sod-6		Sod-7		Sod-8	
	(N)	191	(N)	283	(N)	375	(N)	472	(N)	550	(N)	670	(N)	760	(N)	895
<i>P.ruHe</i>	50	1.000	50	1.000	50	1.000	50	1.000	50	1.000	50	—	50	—	50	—
<i>P.ruSA</i>	50	1.000	50	1.000	50	1.000	50	1.000	50	1.000	50	—	50	—	50	—
<i>P.ruRi</i>	50	1.000	50	1.000	50	1.000	50	1.000	50	1.000	50	—	50	—	50	—
<i>P.ruPi</i>	50	1.000	50	1.000	50	1.000	50	1.000	50	1.000	50	—	50	—	50	—
<i>P.aiCH</i>	50	1.000	50	1.000	50	1.000	50	1.000	50	1.000	50	—	50	—	50	—
<i>P.aiTR</i>	50	1.000	50	1.000	50	1.000	50	1.000	50	1.000	50	—	50	—	50	—
<i>P.aiLM</i>	50	1.000	50	1.000	50	1.000	50	1.000	50	1.000	50	—	50	—	50	—
<i>P.aiSU</i>	50	1.000	50	1.000	50	1.000	50	1.000	50	1.000	50	—	50	—	50	—
<i>P.aiIC</i>	50	1.000	50	1.000	50	1.000	50	1.000	50	1.000	50	—	50	—	50	—
<i>P.aiBU</i>	50	1.000	50	1.000	50	1.000	50	1.000	50	1.000	50	—	50	—	50	—
<i>P.aiCU</i>	50	1.000	50	1.000	50	1.000	50	1.000	50	1.000	50	—	50	—	50	—
<i>P.chiPA</i>	50	1.000	50	1.000	50	1.000	50	1.000	50	1.000	50	—	50	—	50	—
<i>P.chiBE</i>	50	1.000	50	1.000	50	1.000	50	1.000	50	1.000	50	—	50	—	50	—
<i>P.chiTA</i>	50	1.000	50	1.000	50	1.000	50	1.000	50	1.000	50	—	50	—	50	—
<i>P.chiLH</i>	50	1.000	50	1.000	50	1.000	50	1.000	50	1.000	50	—	50	—	50	—
<i>P.niHC</i>	50	1.000	50	1.000	50	1.000	50	1.000	50	1.000	50	—	50	—	50	—
<i>P.niLM</i>	50	1.000	50	1.000	50	1.000	50	1.000	50	1.000	50	—	50	—	50	—
<i>P.flLA</i>	50	1.000	50	1.000	50	1.000	50	1.000	50	1.000	50	—	50	—	50	—
<i>P.flQU</i>	50	1.000	50	1.000	50	1.000	50	1.000	50	1.000	50	—	50	—	50	—
<i>P.vi7A</i>	50	1.000	50	1.000	50	1.000	50	1.000	50	1.000	50	—	50	—	50	—
<i>P.gfWE</i>	50	1.000	50	1.000	50	1.000	50	1.000	50	1.000	50	—	50	—	50	—
<i>P.gfLC</i>	50	1.000	50	1.000	50	1.000	50	1.000	50	1.000	50	—	50	—	50	—
<i>P.gfBC</i>	50	1.000	50	1.000	50	1.000	50	1.000	50	1.000	50	—	50	—	50	—
<i>P.gfFC</i>	50	1.000	50	1.000	50	1.000	50	1.000	50	1.000	50	—	50	—	50	—
<i>P.veSR</i>	40	1.000	40	1.000	40	1.000	40	1.000	40	1.000	40	—	40	—	40	—
<i>P.kuTA</i>	31	1.000	31	—	31	1.000	31	1.000	31	—	31	1.000	31	—	31	—
<i>P.arTI</i>	32	1.000	32	1.000	32	1.000	32	1.000	32	1.000	32	—	32	1.000	32	1.000
<i>P.arTU</i>	32	1.000	32	1.000	32	1.000	32	1.000	32	1.000	32	—	32	1.000	32	1.000
<i>P.re HE</i>	50	1.000	50	1.000	50	1.000	50	1.000	50	1.000	50	—	50	—	50	—

	Pgd-1					Pgd-2			
	(N)	130	126	123	10	(N)	233	221	20
<i>P.ruHe</i>	101	.604	.396	.000	.000	100	.295	.165	.540
<i>P.ruSA</i>	62	.403	.597	.000	.000	62	.210	.226	.565
<i>P.ruRi</i>	74	.628	.372	.000	.000	84	.256	.161	.583
<i>P.ruPi</i>	78	.141	.859	.000	.000	79	.190	.203	.608
<i>p.aiCH</i>	46	.098	.902	.000	.000	46	.478	.152	.370
<i>P.aiTR</i>	33	.061	.939	.000	.000	36	.611	.389	.000
<i>P.aiLM</i>	30	.117	.883	.000	.000	49	.418	.112	.469
<i>P.aiSU</i>	52	.029	.971	.000	.000	54	.722	.278	.000
<i>P.aiLC</i>	94	.096	.904	.000	.000	94	.527	.080	.394
<i>P.aiBU</i>	64	.000	1.000	.000	.000	61	.230	.098	.672
<i>P.aiCU</i>	113	.142	.858	.000	.000	119	.538	.282	.181
<i>P.chiPA</i>	16	.531	.250	.219	.000	16	.625	.063	.313
<i>P.chiBE</i>	27	.444	.426	.130	.000	27	.481	.222	.296
<i>P.chiTA</i>	18	.306	.583	.111	.000	18	.833	.056	.111
<i>P.chiLH</i>	27	.630	.185	.185	.000	27	.704	.111	.185
<i>P.niHC</i>	58	.431	.569	.000	.000	60	.067	.008	.925
<i>P.niLM</i>	69	.486	.514	.000	.000	71	.141	.106	.754
<i>P.fiLA</i>	41	.780	.220	.000	.000	41	.061	.000	.939
<i>P.fiQU</i>	102	.010	.990	.000	.000	68	.118	.199	.684
<i>P.vi7A</i>	53	.009	.849	.142	.000	55	.373	.173	.455
<i>P.gIWE</i>	56	.000	1.000	.000	.000	56	.000	.000	1.000
<i>P.gILC</i>	36	.000	1.000	.000	.000	36	.028	.000	.972
<i>P.gIBC</i>	46	.000	1.000	.000	.000	46	.022	.000	.978
<i>P.gIFC</i>	32	.000	1.000	.000	.000	32	.000	.000	1.000
<i>P.veSR</i>	34	.000	1.000	.000	.000	34	.000	.000	1.000
<i>P.kuTA</i>	26	1.000	.000	.000	.000	26	.000	.000	1.000
<i>P.arTI</i>	47	.936	.021	.000	.043	47	1.000	.000	.000
<i>P.arTU</i>	48	1.000	.000	.000	.000	48	.990	.000	.010
<i>P.re HE</i>	50	1.000	.000	.000	.000	50	.000	.000	1.000

	Prx-1			Prx-2			Prx-3			Prx-4	
	(N)	136	10	(N)	229	20	(N)	321	30	(N)	440
<i>P.ruHe</i>	49	.102	.898	49	.888	.112	33	.742	.258	33	—
<i>P.ruSA</i>	44	.068	.932	44	.466	.534	44	.773	.227	44	—
<i>P.ruRi</i>	40	.063	.938	40	.725	.275	40	.375	.625	40	—
<i>P.ruPi</i>	40	.425	.575	40	.275	.725	40	.287	.712	40	—
<i>p.alCH</i>	34	.779	.221	23	.348	.652	23	.217	.783	23	—
<i>P.alTR</i>	40	.875	.125	40	.075	.925	40	.025	.975	40	—
<i>P.alLM</i>	50	1.000	.000	54	.194	.806	50	.010	.990	50	—
<i>P.alSU</i>	57	.912	.088	57	.404	.596	57	.026	.974	57	—
<i>P.alIC</i>	44	.739	.261	41	.305	.695	41	.195	.805	41	—
<i>P.alBU</i>	98	.786	.214	110	.345	.655	108	.231	.769	105	—
<i>P.alCU</i>	53	.764	.236	53	.198	.802	53	.198	.802	53	—
<i>P.chiPA</i>	50	.250	.750	50	.570	.430	50	.670	.330	50	—
<i>P.chiBE</i>	87	.753	.247	89	.410	.590	88	.625	.375	88	—
<i>P.chiTA</i>	57	1.000	.000	47	.309	.691	55	1.000	.000	55	—
<i>P.chiLH</i>	23	.870	.130	42	1.000	.000	48	.250	.750	48	—
<i>P.niHC</i>	68	.926	.074	67	.687	.313	65	.154	.846	65	—
<i>P.niLM</i>	40	.200	.800	20	.050	.950	40	.237	.762	40	—
<i>P.flLA</i>	90	.867	.133	98	.883	.117	96	.661	.339	96	—
<i>P.flQU</i>	41	.317	.683	41	.720	.280	41	.378	.622	41	—
<i>P.vi7A</i>	110	.123	.877	114	.719	.281	114	.605	.395	114	—
<i>P.gWE</i>	31	.194	.806	31	1.000	.000	31	.565	.435	31	—
<i>P.gILC</i>	26	.519	.481	26	.673	.327	26	.192	.808	26	—
<i>P.gIBC</i>	40	.063	.938	40	.837	.162	40	.275	.725	40	—
<i>P.gIFC</i>	38	.066	.934	38	.724	.276	35	.114	.886	35	—
<i>P.veSR</i>	48	—	—	48	—	—	48	—	—	48	—
<i>P.kuTA</i>	47	.617	.383	47	.851	.149	47	.447	.553	47	—
<i>P.arTI</i>	37	.838	.162	37	.838	.162	37	.270	.730	37	—
<i>P.arTU</i>	41	.720	.280	41	.598	.402	41	.244	.756	41	—
<i>P.re HE</i>	50	—	—	50	—	—	50	—	—	50	1.000
	Prx-5			Prx-6			Prx-7				
	(N)	539	538	537	(N)	632	(N)	725			
<i>P.ruHe</i>	33	—	—	—	33	—	33	—			
<i>P.ruSA</i>	44	—	—	—	44	—	44	—			
<i>P.ruRi</i>	40	—	—	—	40	—	40	—			
<i>P.ruPi</i>	40	—	—	—	40	—	40	—			
<i>p.alCH</i>	23	—	—	—	23	—	23	—			
<i>P.alTR</i>	40	—	—	—	40	—	40	—			
<i>P.alLM</i>	50	—	—	—	50	—	50	—			
<i>P.alSU</i>	57	—	—	—	57	—	57	—			
<i>P.alIC</i>	41	—	—	—	41	—	41	—			
<i>P.alBU</i>	105	—	—	—	105	—	105	—			
<i>P.alCU</i>	53	—	—	—	53	—	53	—			
<i>P.chiPA</i>	50	—	—	—	50	—	50	—			
<i>P.chiBE</i>	88	—	—	—	88	—	88	—			
<i>P.chiTA</i>	55	—	—	—	55	—	55	—			
<i>P.chiLH</i>	48	—	—	—	48	—	48	—			
<i>P.niHC</i>	65	—	—	—	65	—	65	—			
<i>P.niLM</i>	40	—	—	—	40	—	40	—			
<i>P.flLA</i>	96	—	—	—	96	—	96	—			
<i>P.flQU</i>	41	—	—	—	41	—	41	—			
<i>P.vi7A</i>	114	—	—	—	114	—	114	—			
<i>P.gWE</i>	31	—	—	—	31	—	31	—			
<i>P.gILC</i>	26	—	—	—	26	—	26	—			
<i>P.gIBC</i>	40	—	—	—	40	—	40	—			
<i>P.gIFC</i>	35	—	—	—	35	—	35	—			
<i>P.veSR</i>	48	—	—	—	48	1.000	48	1.000			
<i>P.kuTA</i>	47	—	—	—	47	—	47	—			
<i>P.arTI</i>	37	—	—	—	37	—	37	—			
<i>P.arTU</i>	41	—	—	—	41	—	41	—			
<i>P.re HE</i>	50	.420	.140	.440	50	—	50	—			

Got-1											
	(N)	172	169	161	171	170	169,5	168,5	168	167	171,5
<i>P.ruHe</i>	86	.047	.953	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000
<i>P.ruSA</i>	52	.115	.817	.067	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000
<i>P.ruRi</i>	49	.051	.949	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000
<i>P.ruPi</i>	38	.132	.868	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000
<i>p.alCH</i>	39	.000	1.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000
<i>P.alTR</i>	40	.000	1.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000
<i>P.alLM</i>	48	.021	.979	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000
<i>P.alSU</i>	48	.000	.979	.021	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000
<i>P.allC</i>	48	.135	.865	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000
<i>P.alBU</i>	41	.012	.988	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000
<i>P.alCU</i>	87	.034	.966	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000
<i>P.chiPA</i>	49	.163	.837	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000
<i>P.chiBE</i>	56	.161	.598	.241	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000
<i>P.chiTA</i>	70	.114	.886	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000
<i>P.chiLH</i>	113	.133	.867	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000
<i>P.niHC</i>	79	.006	.570	.424	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000
<i>P.niLM</i>	58	.000	1.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000
<i>P.flLA</i>	60	.442	.558	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000
<i>P.flQU</i>	64	.516	.438	.047	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000
<i>P.viTA</i>	72	.063	.903	.035	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000
<i>P.gIWE</i>	91	.110	.385	.000	.000	.505	.000	.000	.000	.000	.000
<i>P.gILC</i>	56	.098	.455	.000	.000	.446	.000	.000	.000	.000	.000
<i>P.gIBC</i>	34	.250	.544	.000	.000	.206	.000	.000	.000	.000	.000
<i>P.gIFC</i>	39	.205	.346	.000	.000	.449	.000	.000	.000	.000	.000
<i>P.veSR</i>	43	.116	.081	.000	.802	.000	.000	.000	.000	.000	.000
<i>P.kuTA</i>	98	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	1.000
<i>P.arTI</i>	27	.000	.000	.000	.000	.000	.796	.204	.000	.000	.000
<i>P.arTU</i>	30	.000	.000	.000	.000	.000	.550	.450	.000	.000	.000
<i>P. re HE</i>	100	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.045	.955	.000

Got-2											Got-3	
	(N)	248	240	234	227	254	239	237	238	236	(N)	349
<i>P.ruHe</i>	61	.590	.270	.082	.057	.000	.000	.000	.000	.000	86	—
<i>P.ruSA</i>	47	.798	.202	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	52	—
<i>P.ruRi</i>	44	.591	.409	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	49	—
<i>P.ruPi</i>	34	.544	.397	.059	.000	.000	.000	.000	.000	.000	38	—
<i>p.alCH</i>	39	.013	.936	.051	.000	.000	.000	.000	.000	.000	39	—
<i>P.alTR</i>	40	.000	.975	.025	.000	.000	.000	.000	.000	.000	40	—
<i>P.alLM</i>	45	.033	.967	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	48	—
<i>P.alSU</i>	45	.056	.889	.056	.000	.000	.000	.000	.000	.000	48	—
<i>P.allC</i>	51	.029	.971	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	48	—
<i>P.alBU</i>	44	.034	.966	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	41	—
<i>P.alCU</i>	87	.034	.966	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	87	—
<i>P.chiPA</i>	67	.134	.866	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	67	—
<i>P.chiBE</i>	57	.044	.956	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	57	—
<i>P.chiTA</i>	68	.074	.926	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	70	—
<i>P.chiLH</i>	112	.009	.991	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	114	—
<i>P.niHC</i>	73	.281	.699	.021	.000	.000	.000	.000	.000	.000	79	—
<i>P.niLM</i>	55	.409	.545	.045	.000	.000	.000	.000	.000	.000	58	—
<i>P.flLA</i>	51	.284	.716	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	60	—
<i>P.flQU</i>	51	.314	.637	.049	.000	.000	.000	.000	.000	.000	51	—
<i>P.viTA</i>	69	.087	.783	.130	.000	.000	.000	.000	.000	.000	72	—
<i>P.gIWE</i>	55	.627	.373	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	55	—
<i>P.gILC</i>	53	.821	.179	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	53	—
<i>P.gIBC</i>	21	.929	.071	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	34	—
<i>P.gIFC</i>	36	.903	.097	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	39	—
<i>P.veSR</i>	34	.000	.000	.000	.000	1.000	.000	.000	.000	.000	34	1.000
<i>P.kuTA</i>	82	.000	.000	.000	.000	.000	.963	.037	.000	.000	100	—
<i>P.arTI</i>	39	.423	.000	.577	.000	.000	.000	.000	.000	.000	31	—
<i>P.arTU</i>	39	.808	.038	.154	.000	.000	.000	.000	.000	.000	31	—
<i>P. re HE</i>	100	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.275	.725	31	—

	Got-4		Got-5		Got-6		Got-7				
	(N)	444	(N)	550	(N)	625	626	60	(N)	724	722
<i>P.ruHe</i>	86	—	86	—	86	.000	.000	1.000	86	—	—
<i>P.ruSA</i>	52	—	52	—	52	.000	.000	1.000	52	—	—
<i>P.ruRi</i>	49	—	49	—	49	.000	.000	1.000	49	—	—
<i>P.ruPi</i>	38	—	38	—	38	.000	.000	1.000	38	—	—
<i>p.aiCH</i>	39	—	39	—	39	.000	.000	1.000	38	—	—
<i>P.aiTR</i>	40	—	40	—	40	.000	.000	1.000	40	—	—
<i>P.aiLM</i>	48	—	48	—	48	.000	.000	1.000	48	—	—
<i>P.aiSU</i>	48	—	48	—	48	.000	.000	1.000	48	—	—
<i>P.aiIC</i>	48	—	48	—	48	.000	.000	1.000	48	—	—
<i>P.aiBU</i>	41	—	41	—	41	.000	.000	1.000	41	—	—
<i>P.aiCU</i>	87	—	87	—	87	.000	.000	1.000	87	—	—
<i>P.chiPA</i>	67	—	49	—	49	.000	.000	1.000	67	—	—
<i>P.chiBE</i>	57	—	56	—	56	.000	.000	1.000	57	—	—
<i>P.chiTA</i>	70	—	70	—	70	.000	.000	1.000	70	—	—
<i>P.chiLH</i>	114	—	113	—	113	.000	.000	1.000	114	—	—
<i>P.niHC</i>	79	—	79	—	79	.000	.000	1.000	79	—	—
<i>P.niLM</i>	58	—	58	—	58	.000	.000	1.000	58	—	—
<i>P.flLA</i>	60	—	60	—	60	.000	.000	1.000	60	—	—
<i>P.flQU</i>	51	—	64	—	64	.000	.000	1.000	51	—	—
<i>P.vi7A</i>	72	—	72	—	72	.000	.000	1.000	72	—	—
<i>P.glWE</i>	55	—	91	—	91	.000	.000	1.000	55	—	—
<i>P.glLC</i>	53	—	56	—	56	.000	.000	1.000	53	—	—
<i>P.glBC</i>	34	—	34	—	34	.000	.000	1.000	34	—	—
<i>P.glFC</i>	39	—	39	—	39	.000	.000	1.000	39	—	—
<i>P.veSR</i>	34	1.000	43	—	43	.000	.000	1.000	34	—	—
<i>P.kuTA</i>	100	—	98	1.000	98	.224	.633	.143	100	—	—
<i>P.arTI</i>	31	—	27	—	27	.000	.000	1.000	31	.839	.161
<i>P.arTU</i>	31	—	30	—	30	.000	.000	1.000	39	.833	.167
<i>P. re HE</i>	31	—	100	—	100	.000	.000	1.000	31	—	—

B-Matriz 1 y 0 (RAPD).

	Primer B01	Primer B07	Primer B10	Primer B08
Pg/LC/42b	010001000111	0010111101000	0100101111010	0001011
Pg/LC/55b	001001000111	0010111101000	1110111111010	0001011
Pg/LC/17b	001001000111	0010111101000	1110001111010	0000011
Pg/LC/23b	001111000011		1100111111010	0000011
Pg/LC/25b	000001000101		0100001110010	0000011
Pg/LC/03a	001001010101	0010111101110	0100101111110	0110111
Pg/LC/05b	001111000101	0010111101110	0111001111110	0100011
Pg/LC/01a	101001100011	1110111101111	1110111111110	0111011
Pg/LC/02a	101001000011	0110101101111	1110111111110	0111011
Pg/LC/02b	101001000011	0010101101111	0000111111111	0111011
Pg/LC/03b	001111000101	0000101101111	0100001111010	0111111
Pg/LC/04a	101001000011	0010101101111	1110111111110	0100011
Pg/LC/04b	001001000011		0110111111010	0110111
Pg/LC/05a	001001000111		1110111111110	0101111
Pg/LC/03b	000001000111	0010111101000	0000001111010	0000111
Pg/LC/06b	011001000111	0010111101000	1110111111010	0000111
Pg/LC/07b	011001000111	0010111101000	0110111111010	0100111
Pg/LC/08b	011001000111	0010111101000	1110111111010	0000111
Pg/LC/11b	011001000111	0010111101010	0110111111010	0000111
Pg/LC/12b	001001000111	0010111101010	1110111111010	
Pg/LC/18b	011001000111	0010111101010	0100110111010	0000111
Pg/LC/20b	001001001111	0010111101010	1110111111010	0000101
Pg/LC/21b	001001000011		1110011111010	0000111
Pg/LC/22b	001101000011		1110011111010	0000111
Pg/LC/26b	000001000101	0010111101110	1100101110010	0100011
Pg/LC/27b	011001001011	0010111101110	1110111111110	0100111
Pg/LC/28b	010001000111	0010111101110	1110111111110	0000011
Pg/FC/01a	011001111101		1110111111110	1111111
Pg/FC/01b	011001111100	0110110101111	0110111111010	0010111
Pg/FC/02a	011001111100	0101110101111	0110111111110	0010111
Pg/FC/03a	001001111101	0010101101111	0110101111010	0111111
Pg/FC/03b	001001101101	0010100101010	0010101111010	0011011
Pg/FC/04a	001001101100	0010101100010	0110111111010	0111011
Pg/FC/05a	011001101100		0100111111010	0011011
Pg/FC/05b	011001101101		0000101111010	0111111
Pg/BC/01a	001001111101	0010111101110	0110101111110	0011011
Pg/BC/02a	011001010101	0010111101110	0110101111110	0001011
Pg/BC/03a	001001010101	0010111101110	0100101111110	0011111
Pg/BC/03b	001001010101	0010111101110	0100101111110	0001000
Pg/BC/04a	001001010101	0010111101110	0100101111110	0010011
Pg/BC/04b	011001010101	1010111101110	1100101111110	0011011
Pg/BC/05a	001001110101	0010111101110	0100101111110	0111011
Pg/BC/05b	001001010101	0010111101110	0100101111110	0010011
Pg/BC/01f	001111000101	0101111101110	1110001111010	0001011
Pg/BC/01g	000011000101	0111111101110	1111001111010	0111011
Pg/BC/01h	001001100101	0110011101110	0111001111010	0011011
Pg/BC/02e	001011000101	0110011101110	0110001111010	1000011
Pg/BC/02f	001011000101	0100011101000	0100001111000	
Pg/WE/04b	001001000111	0010111101110	0111001111110	0000111
Pg/WE/04a	0010010001110	010111101110	0111001111110	0010011
Pg/WE/02a	0010010001110	010111101110	0111001111110	0010011
Pg/WE/05b	0010011001110	010111101110	0111001111110	0111011
Pg/WE/03a	1010010001010	010111101110	0111001111110	0000011
Pg/WE/05a	0000110001010	010111101110	0111001111110	0000111
Pg/WE/03b	0000011001010	010111101110	0111001111110	0000011

Pg/WE/02b	1010010001110	010111101110	0111001111110	0010111
Pg/WE/02b	0000110001010	110101101000	0111001111000	0111011
Pg/WE/05e	0000110001010	110101101110	0101001111010	1011011
Pg/WE/05f	0000110001010	110111101110	0101001111010	0111011
Pg/WE/05g	0000110001010	110111101110	1101001110010	0011111
Pv/AR/01a	0010010000110	100001101000		0011011
Pv/AR/01b	0011110000110	100001101000	1100101111010	0001011
Pv/AR/01c		010000110100	0110011111100	0001011
Pv/AR/01d	0011010000010	100001101000	1100001111010	0000011
Pv/AR/01e	0010110000110	110001101000	1100001011010	0001011
Pv/AR/02a	0010110000110	110001001000	0100001000010	0000011
Pv/AR/02b	0010110000000	100001001000	1100011001010	1001011
Pv/AR/02c	0010110000000	100001101000	1100011001010	1001011
Pv/AR/02d	0000110001010	100001001000	1100001001010	1000011
Pv/AR/02e	0010110001010	110001101000	1100001000010	0011001
Pv/AR/03a	0011010000000	100001101000	0100001111010	0000011
Pv/AR/03b	0011110000110	100001101000	1100001111000	0000011
Pv/AR/03c	0010110000110	100001001000	1100001011010	0000111
Pv/AR/03d	0011010000010	110001001000	1101001000010	0000011
Pv/AR/03e	0010110000110	100001001000	0100011011010	0001111

C- Matriz 1 y O (RFLP).

ACA	111110111010110110110111011111100110100010111101010111111
ALB	1111011111010010000001011111111011010010110111101101010111
RUS	1111011111010010000001011111111011010010110111101101010111
VIN	1111011111010010000001011111111011010010110111101101010111
FLE	1111011111010010000001011111111011010010110111101101010111
KUN	1111101110011010010001011111111011011001110111101101010111
NIG	1111011111010010000001011111111011010010110111101101010111
GLA	1111011111010010000001011111111011010010110111101101010111
REP	111110111001101001001100111111101101000111011011010010111
CAL	1111011111010010000001011111111011010010110111101101010111
AFF	1111011111010010000001011111111011010010110111101101010111
ALP	1111011111010010000001011111111011010010110111101101010111

D-Secuencias Alineadas (*TrnT-TrnD*).

ACA	TAGCCA-CTA	TGA-GTCTAG	T-ACATATAT	TTATTACTG-	CATATACTTA	TTATATGTTA
ALB	TAGCCG-GGA	TGAGGTCTAC	T-GCATATAT	CTATTACTG-	CATATACTTA	TGATAT----
RUS	TAGCCACGGA	TGAG-TCTAG	TTGCATATAT	TTATTACTGG	CATATACTTA	TTATAT--2-
VIN	TAGCCA-CTA	TGA-GTCTAG	T-GCATATAT	TTATTACTG-	CATATACTTA	TTATAT----
FLE	TAGCCA-CTA	TGAG-TCTAG	T-GCATATAT	TTATTACTG-	CATATACTTA	TTATAT----
KUN	TAGCCA-CTA	TGA-GTCTAG	T-GCATATAT	TTATTACTG-	CATATACTTA	TTATAT----
NIG	TAGCCA-CTA	TGAG-TCTAG	T-GCATATAT	TTATTACTG-	CATATACTTA	TTATAT----
GLA	TAGCCA-CTA	TGA-GTCTAG	T-GCATATAT	TTATTACTG-	CATATACTTA	TTATAT----
REP	TAGCCA-CTA	TGA-GTCTAG	TTGCATATAT	TTATTACTGG	CATATACTTA	T---1-----
CAL	TAGCCG-GGA	TGAG-TCTAC	T-GCATATAT	CTATCACTG-	CATATACTTA	TGATAT----
AFF	TAGCCG-GGA	TGAG-TCTAG	T-GCATATAT	CTATTACTG-	CATATACTTA	TGATAT----
ALP	TAGCCGCGGA	TGAG-TCTAG	T-GCATATAT	TTATTACTG-	CATATACTTA	TGATAT----
VEL	TAGCCA-CTA	TGAG-TCTAG	T-GCTTATAT	TTATTACTG-	CATATACTTA	TTATAT----
ARG	TAGCCA-CTA	TGA-GTCTAG	T-GCTTATAT	TTATTACTG-	CATATACTTA	TTATAT----
ACA	TATTATATGA	TTATAGTTAT	ATTATATGAT	TATATGAAAT	TTATATGAAA	TGCAAATATA
ALB	TGTTATA-AC	TTATTAT-AT	GTTATATGAT	TATATGAAAT	TTATATGAAA	TTAGAATATA
RUS	-GTTATA-AC	TTATTAT-AT	GTTATATGAT	TATATGAAAT	TTATATGAAA	TTAGAATATA
VIN	-GTTATA-AC	TTATTAT-AT	GTTATATGAT	TATATGAAAT	TTATATGAAA	TTAGAATATA
FLE	-GTTATA-AC	TTATTAT-AT	GTTATATGAT	TATATGAAAT	TTATATGAAA	TTAGAATATA
KUN	-GTTAGA-AC	TTATTAT-AT	GTTATATGAT	TATATGAAAT	TTATATGAAA	TGAGAATATA
NIG	-GTTATA-AC	TTATTAT-AT	GTTATATGAT	TATATGAAAT	TTATATGAAA	TTAGAATATA
GLA	-GTTATA-AC	TTATTAT-AT	GTTATATGAT	TATATGAAAT	TTATATGAAA	TTAGAATATA

REP	-----	----TAT-AT	GTTATATGAT	TATATGAAAT	TTATATGAAA	TTAGAATAGA
CAL	-GTTATA-AC	TTATTAT-AT	GTTATATGAT	TATATGAAAT	TTATATGAAA	TTAGAATATA
AFF	-GTTATA-AC	TTATTAT-AT	GTGATATGAT	TATATGAAAT	TTATATGAAA	TTAGAATATA
ALP	TGTTATA-AC	TTATTAT-AT	GTTATATGAT	TATATGAAAT	TTATATGAAA	TTAGAATATA
VEL	-GTTATA-AC	TTATTAT-AT	GTTATATGAT	TATATGAAAT	TTATATGAAA	TTAGAATATA
ARG	-GTTATA-AC	TTATTAT-AT	GTTATATGAT	TATATGAAAT	TTATATGAAA	TTAGAATATA
ACA	TGTACGTAGA	TACGTTTTAT	CTGCATAGCG	GCTCATTAAAG	GAACAAGAAA	TTGGATTTAG
ALB	TGTATATAGA	TACGTTTTAT	CTGCATAGCG	GCTCATTAAAG	GAACAAGAAA	TTGGATTTAC
RUS	TGTATATAGA	TACGTTTTAT	CTGCATAGCG	GCTCATTAAAG	GAACAAGAAA	TTGGATTTAC
VIN	TGTATGTAGA	TACGTTTTAT	CTGCATAGCG	GCTCATTAAAG	GAACAAGAAA	TTGGATTTAC
FLE	TGTATATAGA	TACGTTTTAT	CTGCATAGCG	GCTCATTAAAG	GAACAAGAAA	TTGGATTTAC
KUN	TGTATATAGA	TACGTTTTAT	CTGCATAGCG	GCTCATTAAAG	GAACAAGAAA	TTGGATTTAC
NIG	TGTATATAGA	TACGTTTTAT	CTGCATAGCG	GCTCATTAAAG	GAACAAGAAA	TTGGATTTAC
GLA	TGTATGTAGA	TACGTTTTAT	CTGCATAGCG	GCTCATTAAAG	GAACAAGAAA	TTGGATTTAC
REP	TGTACATAAA	TACGTTTTAT	CTGCATAGTG	GCTCATTAAAG	GAACAAGAAA	TTGGATTTAC
CAL	TGTATATAGA	TACGTTTTAT	CTGCATAGCG	GCTCATTAAAG	GAACAAGAAA	TTGGATTTAC
AFF	TGTATATAGA	TACGTTTTAT	CTGCATAGCG	GCTCATTAAAG	GAACAAGAAA	TTGGATTTAC
ALP	TGTATGTAGA	TACGTTTTAT	CTGCATAGCG	GCTCATTAAAG	GAACAAGAAA	TTGGATTTAC
VEL	TGTATATAGA	TACGTTTTAT	CTGCATAGCG	GCTCATTAAAG	GAACAAGAAA	TTGGATTTAC
ARG	TGTATATAGA	TACGTTTTAT	CTGCATAGCG	GCTCATTAAAG	GAACAAGAAA	TTGGATTTAC
ACA	CTAGTGAGTA	TAG----TAT	AGGTAAAAT-	-----GGGTT	TATTGATATT	AGATTTTAAT
ALB	CTAGTGAGTA	TAG----TAT	AGGTAAAAT-	-----GGGTT	TTTTGATATT	GGATTTT---
RUS	CTAGTGAGTA	TAG----TAT	AGGTAAAAT-	-----GGGTT	TTTTGATATT	GGATTTT---
VIN	CTAGTGAGTA	TAG--3-TAT	AGGTAAAAT-	-4---GGGTT	TCCCGATATT	GGATCTT-5-
FLE	CTAGTGAGTA	TAG----TAT	AGGTAAAAT-	-----GGGTT	TTTTGATATT	GGATTTT---
KUN	CTAGTGAGTA	TAG----TAT	AGGTAAAAT-	-----GGGTT	TCCTGATATT	GGATTTT---
NIG	CTAGTGAGTA	TAG----TAT	AGGTAAAAT-	-----GGGTT	TTTTGATATT	GGATTTT---
GLA	CTAGTGAGTA	TAG----TAT	AGGTAAAAT-	-----GGGTT	TTTTGATATT	GGATTTT---
REP	CTAGTGAGTA	TAGATAGTAT	AGGTAAAATT	AAAATGGGTT	TCTTGATATT	GGATTTT---
CAL	CTAGTGAGTA	TAG----TAT	AGGTAAAAT-	-----GGGTT	TTTTGATATT	GGATTTT---
AFF	CTAGTGAGTA	TAG----TAT	AGGTAAAAT-	-----GGGTT	TTTTGATATT	GGATTTT---
ALP	CTAGTGAGTA	TAG----TAT	AGGTAAAAT-	-----GGGTT	TCCCGATATT	GGATTTT---
VEL	CTAGTGAGTA	TAG----TAT	AGGTAAAAT-	-----GGGTT	TTTTGATATT	GGATTTT---
ARG	CTAGTGAGTA	TAG----TAT	AGGTAAAAT-	-----GGGTT	TTTTGATATT	GGATTTT---
ACA	TTTCAAATA	TCAATGGAAT	GAATTATTTT	AAAACCGATT	CTAATTGAAT	TGATCCTCAT
ALB	---CTAAATA	TCAATGTAAT	GAATTATTTT	CAAATCGATT	CTAATTGAAT	TGATCCTCAT
RUS	---CTAAATA	TCAATGTAAT	GAATTATTTT	CAAATCGATT	CTAATTGAAT	TGATCCTCAT
VIN	---CTAAATA	TCAATGTAAT	GAATTATTTT	CAAATCGATT	CTAATTGAAT	CGATCCTCAT
FLE	---CTAAATA	TCAATGTAAT	GAATTATTTT	CAAATCGATT	CTAATTGAAT	TGATCCTCAT
KUN	---CTAAATA	TCAATGTAAT	GAATTATTTT	AAAATCGATT	CTAATTGAAT	TGATCCTCAT
NIG	---CTAAATA	TCAATGTAAT	GAATTATTTT	CCAATCGATT	CTAATTGAAT	TGATCCTCAT
GLA	---CTAAATA	TCAATGTAAT	GAATTATTTT	CAAATCGATT	CTAATTGAAT	TGATCCTCAT
REP	---CTAAATA	TCAATGTAAT	GAATTATTTT	C-AAACCGATT	CTAATTGAAT	TGATCCTCAT
CAL	---CTAAATA	TCAATGTAAT	GAATTATTTT	CAAATCGATT	CTAATTGAAT	TGATCCTCAT
AFF	---CTAAATA	TCAATGTAAT	GAATTATTTT	CAAATCGATT	CTAATTGAAT	TGATCCTCAT
ALP	---CTAAATA	TCAATGTAAT	GAATTATTTT	CAAATCGATT	CTAATTGAAT	TGATCCTCAT
VEL	---CTAAATA	TCAATGTAAT	GAATTATTTT	CAAATCGATT	CTAATTGAAT	TGATCCTCAT
ARG	---CTAAATA	TCAATGTAAT	GAATTATTTT	AAAATCGATT	CTAATTGAAT	TGATCCTCAT
ACA	CCTAACCGAA	ATTCATTTGA	TTGATACATG	TATCCACCAA	TTCAAACTT	AGATACCAGA
ALB	CCTAA-CGAA	ATTCATTTGA	TTGATACATG	TATCCACC-A	ATTCAA-CAT	AGATACCAGA
RUS	CCTAA-CGAA	ATTCATTTGA	TTGATACATG	TATCCACC-A	ATTCCA-CAT	AGATACCAGA
VIN	CCCTAACGAA	ATTCATTTGA	TTGATACATG	TATCCACC-A	ATTCAA-CCT	AGATACCGAT
FLE	CCTAA-CGAA	ATTCATTTGA	TTGATACATG	TATCCACC-A	ATTCAA-CCT	AGATACCAGA
KUN	CCTAA-CGAA	ATTCATTTGA	TTGAGACCTG	TATCCACC-A	ATTCCA-CAT	AGATACCAGA
NIG	CCTAA-CGAA	ATTCATTTGA	TTGATACATG	TATCCACC-C	ATTCAA-CCT	AGATACCAGA
GLA	CCTAAACGAA	ATTCATTTGA	TTGATACCTG	TATCCACCAA	TTCAA-CCT	AGATACC-GA
REP	CCT-AACGAA	ATTCATTTGA	TTGATACATG	TATCCACC-A	ATTCCA-CAT	AGATACCAGA
CAL	CCTAA-CGAA	ATTCATTTGA	TTGATACATG	TATCCACC-A	ATTCAA-CAT	AGATACCAGA
AFF	CCTAA-CGAA	ATTCATTTGA	TTGATACATG	TATCCACC-A	ATTCAA-CAT	AGATACCAGA
ALP	CCTAA-CGAA	ATTCCTTTGA	TTGATACATG	TATCCACCCA	ATTCCA-CCT	AGATACCAGA
VEL	CCTAA-CGAA	ATTCATTTGA	TTGATACATG	TATCCACC-A	ATTCAA-CAT	AGATACAAGA

ARG	CCTAA-CGAA	ATTCATTTGA	TTGATACATG	TATCCACC-A	ATTCAA-CAT	AGATAGAAGA
ACA	TTTTTCCATC	GAATCGTTGA	TAAAT-GGGT			
ALB	TTTTTC-ATC	GAATCGTTGA	TAAAT-GGGT			
RUS	TTTTTC-ATC	GAATCGTTGA	TAAAT-GGGT			
VIN	TTGTTC-ATC	GAAAT-CCGT	TGGAT-AAAT			
FLE	TTTTTC-ATC	GAATCGGTGA	TAAAT-GGGT			
KUN	TTTTTC-CTC	GAATCGCTGA	TAAAT-GAAT			
NIG	TTTTTC-ATC	GAATCGTTGA	TAAAT-GGGT			
GLA	TTTTTC-ATC	GAATCGTTGA	TAAAT-GGGT			
REP	TTTGTC-ATC	GAATCGTTGA	TAAAT-GGGT			
CAL	TTTTTC-ATC	GAATCGTTGA	TAAAT-GGGT			
AFF	TTTTTC-ATC	GAATCGTTGA	TAAAT-GGGT			
ALP	TTTTTC-ATC	GAATCGTTGA	TAAAT-GGGT			
VEL	TTTTTC-ATC	GAATCGTTGA	TAAAT-GGAT			
ARG	TTTTTC-ATC	GAATC---GT	TGGATTAAAT			
ACA	AGTGT-CATC	ATACATATGC	T-TACGATTT	CATTCAAACC	TTTTCTATTG	TGATTTTAGA
ALB	AGTG-GCATC	ATGCATATGC	TCTACGATCC	CATTCAAACC	TTTGCTATAT	CGATTTTAGA
RUS	AATGTGCATC	ATGCATATGC	T-TACGATTT	CATTCAAACC	TTTGCTATAT	CGATTTTAGA
VIN	AATG-ACATC	ATGCATATTC	T-TACGATTT	CATTCAAACC	TTTTCTATTT	CGATTTTAGA
FLE	AATGTGCAGC	ATGCATATGC	T-TACGATTT	CATTCAAACC	TTTTCTATTT	CGATTTTAGA
KUN	AATGTACAGC	ATGCATATTC	T-TACGATTT	CATTCAAACC	TTTTCTATTT	CGATTTTAGA
NIG	AATGTACAGC	ATGCATATTC	T-TACGATTT	CATTCAAACC	TTTTCTATTT	CGATTTTAGA
GLA	AATG-ACAGC	ATGCATATTC	T-TACGATTT	CATTCAAACC	TTTTCTATTT	CGATTTTAGA
REP	AATG-ACAGC	ATGCATATTC	T-TACGATTT	CATTCAAACC	TTTTCTATTT	CGATTTTAGA
CAL	AGTG-GCAGC	ATGCATATGC	T-TACGATCC	CATTCAAACC	TTTGCTATAT	CGATTTTAGA
AFF	AGTGTGCAGC	ATGCATATGC	T-TACGATCC	CATTCAAACC	TTTGCTATAT	CGATTTTAGA
ALP	AGTG-GCAGC	ATGCATATGC	T-TACGATTT	CATTCAAACC	TTTGCTATTT	CGATTTTAGA
VEL	AATGTACAGC	ATGCATATTC	T-TACGATTT	CATTCAAACC	TTTTCTATTT	CGATTTTAGA
ARG	AATGTACAGC	ATGCATATTC	T-TACGATTT	CATTCAAACC	TTTTCTATTT	CGATTTTAGA
ACA	TTAGAATGGT	CTTGTTTCTA	ACTGGCAGAG	GCTGGACTAA	TATATTGATA	TG---6---T
ALB	TTAGAATTGT	CTTG-TTCTA	ACTGGCGGAG	GCGGGACTAA	TATATTGATA	TTCTTTTTTT
RUS	TTAGAATTGT	CTTG-TTCTA	ACTGGCGGAG	GCGGGACTAA	TATATTGATA	TTCTTTTTTT
VIN	TTAGAATTGT	CTTG-TTCTA	ACTGGCGGAG	GCGGGACTAA	TATATTGATA	TTCTTTTTATT
FLE	TTAGAATTGT	CTTGTTTCTA	ACTGGCGGAG	GCGGGACTAA	TATATTGATA	TTCTTTTTTT
KUN	TTAGAATTGT	CTTGTTTCTA	ACTGGCGGAG	GCGGGACTAA	TATATTGATA	GT-TTTTTTT
NIG	TTAGAATTGT	CTTGTTTCTA	ACTGGCGGAG	GCGGGACTAA	TATATTGATA	TTCTTTTTTT
GLA	TTAGAATTGT	CTTGTTTCTA	ACTGGCGGAG	GCGGGACTAA	TATATTGATA	TTCTTTTTTT
REP	TTAGAATTGT	CTTG-TTCTA	ACTGGCAGAG	GCGGGACTAA	TATATTGATA	TT-----T
CAL	TTAGAATTGT	CTTG-TTCTA	ACTGGCGGAG	GCGGGACTAA	TATATTGATA	TTCTTTTTTT
AFF	TTAGAATTGT	CTTGTTTCTA	ACTGGCGGAG	GCGGGACTAA	TATATTGATA	TTCTTTTTTT
ALP	TTAGAATTGT	CTTG-TTCTA	ACTGGCGGAG	GCGGGACTAA	TATATTGATA	TTCTTTGACT
VEL	TTAGAATTGT	CTTG-TTCTA	ACTGGCGGAG	GCGGGACTAA	TATATTGATA	TTCTTTTTTT
ARG	TTAGAATTGT	CTTG-TTCTA	ACTGGCGGAG	GCGGGACTAA	TATATTGATA	TT-TTTTTTT
ACA	ATATCAATAT	GCACTTTAGC	GAGATCTACA	CGGATTACTA	GTAATCTGTT	TGTGATTTCC
ALB	ATATGGATAT	GCACTTTAGC	GAGATCTACA	CGGATTACTA	GTAATCTGTT	TGTTATTTCC
RUS	ATATGGATAT	GCACTTTAGC	GAGATCTACA	CGGATTACTA	GTAATCTGTT	TGTTATTTCC
VIN	ATATGGATAT	GCACTTTAGC	GAGATCTACA	CGGATTACTA	GTAATCTGTC	TGTAATTTCC
FLE	ATATGGATAT	GCACTTTAGC	GAGATCTACA	CGGATTACTA	GTAATCTGTT	TGTTATTTCC
KUN	ATATGGATAT	GCACTTTAGC	GAGATCTACA	CGGATTACTA	GTAATCTGTT	TGTGATTTCC
NIG	ATATGGATAT	GCACTTTAGC	GAGATCTACA	CGGATTACTA	GTAATCTGTT	TGTTATTTCC
GLA	ATATGGATAT	GCACTTTAGC	GAGATCTACA	CGGATTACTA	GTAATCTGTT	TGTTATTTCC
REP	ATATGGATAT	GCACTTTAGC	GAGATCTACA	CCGATTACTA	GTAATCTGTT	TGTGATTTCC
CAL	ATATGGATAT	GCACTTTAGC	GAGATCTACA	CGGATTACTA	GTAATCGGTC	TGTTATTTCC
AFF	ATATGGATAT	GCACTTTAGC	GAGATCTACA	CGGATTACTA	GTAATCTGTT	TGTTATTTCC
ALP	ATATGGATAT	GCACTTTAGC	GAGATCTACA	CGGATTACTA	GTAATCTGTC	TGTGATTTCC
VEL	ATATGGATAT	GCACTTTAGC	GAGATCTACA	CGGATTACTA	GTAATCTGTT	TGTTATTTCC
ARG	ATATGGATAT	GCACTTTAGC	GAGATCTACA	CGGATTACTA	GTAATCTGTT	TGTTATTTCC
ACA	AAATCGATTG	AAAATCAATC	TTTCAATAAA	TCAACGAAGG	TTAAAAAGAG	TCTCGGATTT
ALB	AAATCGATTG	AAAATAAATC	TTTCAATAAA	TCAATGAAAA	TAAAAAAGAG	TCTCTTTTT-
RUS	AAATCGATTG	AAAATAAATC	TTTCAATAAA	TCAATGAAAA	TAAAAAAGAG	TCTCTTTTT-

VIN	AAATCGATTG	AAAATAAATC	TTTCAATAAA	TCAGTGAAAA	TAAAAAAGAG	TCTCTGTGT-
FLE	AAATCGATTG	AAAATAAATC	TTTCAATAAA	TCAATGAAAA	TAAAAAAGAG	TCTCTTTGT-
KUN	AAATCGATTG	AAAATAAATC	TTTCAATAAA	TCAATGAAAA	TAAAAAAGAG	TCGCTTAGG-
NIG	AAATCGATTG	AAAATAAATC	TTTCAATAAA	TCAATGAAAA	TAAAAAAGAG	TCTCTTTTT-
GLA	AAATCGATTG	AAAATAAATC	TTTCAATAAA	TCAATGAAAA	TAAAAAAGAG	TCTCTTTGG-
REP	AAATCGATTG	AAAATAAATC	TTTCAATAAA	TCAATGAAAA	TAAAAAAGAG	TCTCTTTTT-
CAL	AAATCGATTG	AGAATAAATC	TTTCGATAAA	TCAGTGAAAA	TAAAAAGGAG	TCTCTTAAT-
AFF	AAATCGATTG	AAAATAAATC	TTTCAATAAA	TCAATGAAAA	TAAAAAAGAG	TCTCTTTTT-
ALP	AAATCGATTG	AAAATAAATC	TTTCAATAAA	TCAATGAAAA	TGAAACAGAG	TCTCTTGGCC
VEL	AAATCGATTG	AAAATAAATC	TTTCAATAAA	TCAATGAAAA	TAAAAAAGAG	TCTCTTTTC-
ARG	AAATCGATTG	AAAATAAATC	TTTCAATAAA	TCAATGAAAA	TAAAAAAGAG	TCTCTTTTT-

ACA	ATTAGACTC	TATGCTTACA	GATCTTGATA	TGAATCTACA	TCATGAGCAG	GATCTGAATC
ALB	ATTAGACTT	TATACTTACA	GATCTTGATA	TGAATCTAGA	TCATTAGCAA	GATCTTAATT
RUS	ATTAGACTT	TATACTTACA	GATCTTGATA	TGAATCTAGA	TCATTAGCAA	GATCTTAATT
VIN	ATTAGACTT	GATACTTACA	GATCGTGATA	TGAATCTAGA	TCAGTAGCAA	GATCTTAATT
FLE	ATTAGACTT	TATACTTACA	GATCTTGATA	TGAATCTAGA	TCATTAGCAA	GATCTTAATT
KUN	ATTATACTT	GATACTTACA	GATCGTGATA	TGAATCTAGA	TCATTACCAG	GATCTGAATT
NIG	ATTAGACTT	TATACTTACA	GATCTTGATA	TGAATCTAGA	TCATTAGCAA	GATCTTAATT
GLA	ATTAGACTT	TATACTTACA	GATCGTGATA	TGAATCTAGA	TCAGTAGCAA	GATCTTAATT
REP	ATTAGACTT	TATACTTACA	GATCTTGATA	TGAATCTAGA	TCATTAGCAA	GATCTGAATT
CAL	ATTAGACTT	GATACTTACA	GATCTTGATA	TGAATCTAGA	TCAGTACCCA	GATCTTAATT
AFF	ATTAGACTT	TATACTTACA	GATCTTGATA	TGAATCTAGA	TCATTAGCAA	GATCTTAATT
ALP	ATTAGACTT	GATACTTACA	GATCG-GATA	TGAATCTAGA	TCAGTAGCAA	GATCTTAATT
VEL	ATTAGACTT	TATACTTACA	GATCTTGATA	TGAATCTAGA	TCATTAGCAA	GACCTTAATT
ARG	ATTAGACTT	TATACTTACA	GATCTTGATA	TGAGTCTAGA	TCATTAGCAA	GATCTGAATT

ACA	TGGCGGAAAA	CATACGT
ALB	TGTGGAAAAA	AT-ACGT
RUS	TGTGGAAAAA	AT-ACGT
VIN	TGTGGAAAAA	AT-ACGT
FLE	TGTGGAAAAA	AT-ACGT
KUN	CGTGGAAAAA	AT-ACGT
NIG	TGTGGAAAAA	AT-ACGT
GLA	TGTGGAAAAA	AT-ACGT
REP	TGTGGAAAAA	AT-ACGT
CAL	TGTGGAAAAA	ATTACGT
AFF	TGTGGAAAAA	AT-ACGT
ALP	TGTGGAAAAA	ATACCGT
VEL	GGGGGAAAAA	AT-ACGT
ARG	TGTGGAAAAA	AT-ACGT

E-Secuencias Alineadas (ITS-1 e ITS-2).

VULGARIS	TCGATGCCTC	AA-2--ACAA	TTCCACCCGC	GAATACGTAC	CAAACACACA	ACAACGCGCA
CALDENIA	CAAATGCCAA	TGC--GAAAG	CACGACCTGT	GAACCGGTTG	ACACAAGTCT	GG-5-TTGCG
NIGRA	CTAATGCCAA	TGC3--CAAAG	CATGACCTGT	GAACCAAGTTG	ACACAAGTCT	TG-4--GGCG
AFFINIS	TAGATGCCAA	AGC--GAAAG	CGCGACCTGT	GAACCGGTTG	ACACAAGTCT	CG----GGCG
ALBA	TAGATGCCAA	TAC--GAAAG	CATGACCCGT	GAACCGGTTG	ACACAAGTCT	CG---ATGCG
VINALILLO	TAGATGCCAA	AGC--GAAAG	CGTGACCTGT	GAACCGGTTG	ACACAAGTCT	G----CCGCG
GLANDULOSA	TAGATGCCAA	ATC--AAAAG	CACGATCTGT	GAACCAAGTTG	ACGCAAGTCT	TG---TGGCG
RUSCIPOLIA	TAGATGCCAA	AGC--GAAAG	CACGACCTGT	GAACCGGTTG	ACACAAGTCT	GG---TTGCG
ALPATACO	--AATGCCAA	AGC--AAAAG	CACGACCCGT	GAACCGGTTG	ACACAAGTCT	CG---AG-CG
VELUTINA	--AATGCCAA	AGC--GAAAG	CATGACCTGT	GAACCAAGTTG	ACACAAGTCT	CG---AG-CG
KUNTZEI	-TAATGCCAA	AGG--AAAAG	CGCGACCCAT	GAACCTGGTTG	ACACAAGTCT	CA---AG-CG
FLEXUOSA	TGCATGCCAA	AGC--AAAAG	CACGACCTGT	GAACCAAGTTG	ACACAAGTCT	CG---ATTGCG
ARGENTINA	-TAATGCCAA	AGC--GAAAG	AGCGACCCGT	GAACCGGTTG	ACACAAGTCT	CG---AT-CG
REPTANS	-----1--A	AAC--TAAAG	AAGGATCATT	GAACCTGTGG	AAGGATCATT	GA-ACCTGCG

VULGARIS	AGGCCAGCGG	GGGCACGCAA	GTTCTCCAC	NACCAAGTGC	GT-TGTCGAG	AGCGGGGGTG
CALDENIA	GGGGCAGAAG	GC---CGAAG	GTGCCACAGC	GCCCGAAGTC	TCTGCCTGCT	CACGCCAGGG
NIGRA	GGGGCAGAAG	GC-7-CGAAG	GTGCCACGGC	GCCCGAAGTC	TTTGCCTGCA	CACGCTGAGG
AFFINIS	GGGGCAGAAG	GC---CCAAG	GTGCCACAAC	GCCCAAAGTC	TCTGCCTGCG	CATGCTGAGG
ALBA	GGGGCAGAAG	GC---TGAAG	GTGCCACGGT	GCCCAAAGTC	TCTGCCCCTG	CACGCTGGGG
VINALILLO	GGGGCAAAAG	GC---CCAAA	GTTCCACAGC	GCTCCAAGTC	TGGGGCAGGT	CATGCTAATG

GLANDULOSA	GGGGCAGAAG	GC---CGAAG	GTGCCACGGC	GCCCGAAGTC	TTTGCCCTGCA	CACGCTGAGG
RUSCIFOLIA	GGGGCAAAAG	GC---CCAAA	GTGCCACGGC	GCCCGAAGTC	TGGGGCTGGT	CACGCTGATG
ALPATACO	GGGGCAAAAG	GC---CGAAG	GTGCCACGGC	GCCCGAAGTC	TCTGCCTGCG	CACGCTGGGG
VELUTINA	GGGGCAAAAG	GC---CGAAG	GTGCCACGGC	GCCCGAAGTC	TCTGCCTGCG	CACGCTGGGG
KUNTZEI	GGGGCAGAAG	GC---TGAAG	GTGCCACGGT	GCCTGAAATC	CCTGCCCGTG	CTCGCCGGGG
FLEXUOSA	GGGGCAAAAG	GC---CGAAG	GTGCCACGGC	ACCCGAAGTC	TTTGCCCTGCA	CACACTGAGG
ARGENTINA	GGGGCAGAAG	GC---TGAGG	GTGCCATGGC	GCCCGAAGTC	TCTGCCGGCG	GGCG----9-
REPTANS	GAAGGAT---	6----CATTG	AACCTGCGGA	--8--AGAGC	ATTGTTTGTG	TGGAGGGGGT
VULGARIS	GGCGTCTTGA	TGCCTTGTGC	ATCCGGTCCG	AAACCCGTGT	CTCCCGACAA	AA-ACTAACC
CALDENIA	ACAGTTCTCTG	TGGGTCA-GC	GCA-----	-GGCCCCAGC	CCCAGCATCG	AA----AACC
NIGRA	ATAGATTCTG	TGCATTA-GC	ACA-----	-GGCCCTAGC	CCCAACAACC	AA----AACC
AFFINIS	ATGGGTCCCTG	TGCATCA-GC	ACA---10--	-GGCCCCAGC	CCCAACAACC	AA----AACC
ALBA	GCGGGTCCCTA	TTCTTCG-GC	GTA-----	-GGCCCCAGC	CCCATCACCA	AA----AACC
VINALILLO	ATAATTCGAG	CTGGTCA-CA	GCT-----	-GGCCCCACC	CCCACCATGG	AA----AACC
GLANDULOSA	ACAGATTCTG	TGCATTA-GC	ACA-----	-GGCCCCAGT	CCCAACAACC	AA----AACC
RUSCIFOLIA	ATAGTTTCTG	TGGGTCA-CC	GCA-----	-TGCCCCAGC	CCCAACCTGG	AA----AACC
ALPATACO	GCGGGTCCCTG	TGTGTCG-GC	ATA-----	-GGCCCCAGC	CCTGGCTCCA	AA----AACC
VELUTINA	GCGGGTCCCTG	TGTGTCG-GC	ATA-----	-GGCCCCAGC	CCTGGCTCCA	AA----AACC
KUNTZEI	ATTAGTCCCTG	TGCGTTG-GT	GCAAG11ATC	CGGTCCCAAC	TCCAACAACC	AA----AACC
FLEXUOSA	ACAAATCCTG	TGTTTCA-GC	ATA-----	-GGCCCCAGC	CCCAGCATCA	AA----AACC
ARGENTINA	---GGTCCCTG	TGCGTCG-GC	ATAGG---CCC	CAGCCCCAAC	CCCAACAACC	AA-12-AACC
REPTANS	TCTGAACCCG	CCAGGTG-AT	CCGAAATTCA	CTTCTATATG	ACCAGCACCG	AGATTCCGGT
VULGARIS	CCGGCGTTTT	ACGCGCCAAG	GAAAACGAAG	CTGTTAGGTG	AGGCAAACGG	GGGACGTGTC
CALDENIA	ACGGGTCCAG	GAGCATAAAT	GAAGTGAAC	CGACGACAGG	TCGTCCGTGC	TCTGGCTCGC
NIGRA	CCGGCGCCAC	AGGCGTGAAG	GAAGTGAAC	CAAACAAAAC	ACGTCAATTG	TCGCTCGGGC
AFFINIS	CCGGCTCCAG	AGGCTTAAAC	GAACCGAAC	CAAGCAAAA	ACGTCCTTGG	TCATTTTCGC
ALBA	CGAGGCCCAA	GGGCTTAAAG	AACCTGGAAC	CAACACCAAG	CGCAGTTTGT	TGTCCGGGGC
VINALILLO	CCGGGTCCAG	GAGCCTCAAT	GAAGTGAAG	CCACGATAGG	TCGTCCTAGC	TCCGTTACCC
GLANDULOSA	CCGGCGCCAC	AGGCGTGAAG	GAAGTGAAC	CAAGCAAAA	ACGTCCGTTG	TTGCTCGGGC
RUSCIFOLIA	ACGGGTCCAG	GAGCCTAAT	GAAGTGAAC	CCACCATAGG	TCGTCCTAGC	TCCGTCACGC
ALPATACO	CCGGCCCCAG	AGGCATAAAG	GTCCCGGAAC	CAAACACAAC	CCGTCCCTCG	TCTCGGTGCG
VELUTINA	CCGGCCCCAG	AGGCATAAAG	GTCCCGGAAC	CAAACACAAC	CCGTCCCTCG	TCTCGGTGCG
KUNTZEI	CTAACGCCAC	AGGGGTAAAG	GAATCCCAAC	CAAGCAAAGC	ATGCCGTTGG	TCGCCCCGAGC
FLEXUOSA	CCGGTCCCAG	AGTCTTAAAG	GTCTGGAAT	CAAGCAAAA	CTGTGCTCGC	TGTTTCGGGC
ARGENTINA	CCGGTGCCAC	AGGG-TTAAG	GGAAGTGAAC	CAAACAAAAC	AAAGCGTTGG	TTAGCCGGGG
REPTANS	TAAGGGCGAC	GACTGGCAAG	AGAAGTCCAC	CAAACACACG	GATTCTTGGT	GGCTACACTG
VULGARIS	CCGGGGGCGC	CTTACGATG	ACATGTT			
CALDENIA	AC-CGGCGTC	GGTTATCATG	GCTTTTA			
NIGRA	AC-CGGTGCC	GGCCAGAATT	GCGTATC			
AFFINIS	AT-CAGTGCC	GGCCATCATG	GCGTTTC			
ALBA	CC-CATTGTC	GGCAATATTA	GCTTTTA			
VINALILLO	GC-CAGTGTC	GGCTGTCATG	CCATTTA			
GLANDULOSA	AC-CGGTGCC	GGCTAGTATT	GCGTATC			
RUSCIFOLIA	AC-CGGTGTC	GGCTATCATG	GCAATATC			
ALPATACO	CC-TGGTAGC	GGTGACCGTC	GCTTTTG			
VELUTINA	CC-TGGTAGC	GGTGACCGTC	GCTTTTG			
KUNTZEI	AC-TGGTGCT	GGCCATCGTT	GCGTATC			
FLEXUOSA	CC-CGGTGCC	GGTCACCATC	GGTTTTC			
ARGENTINA	AT-CCGGTCC	GGACAACATT	GCCTATT			
REPTANS	GC--AGGCAT	GGCAAGCCGA	GCGTTTC			
VULGARIS	AC	ACTTAACCAG				
CALDENIA	AA	AATTAATAGG				
NIGRA	AA	AGTCGCTAGT				
AFFINIS	CA	AATTGCCAGT				
ALBA	-A	AGTTGCCAGC				
VINALILLO	CA	AATCGATTGT				
GLANDULOSA	AA	AGTCGCTAGT				
RUSCIFOLIA	CA	AGTCAATAGT				
ALPATACO	AA	AGTTGCCAGG				
VELUTINA	AA	AGTCGCTAGT				
KUNTZEI	AA	AGTCGCCAGC				

FLEXUOSA AA ANTCGCTAGT
 ARGENTINA AA AGTCTCCAGT
 REPTANS AA AGTCGCCAGT

VULGARIS	TTAATGTGA	GGCAGTGGGT	GAAAGTTGAC	CTCCCGCAG	CCAGTTCCTC	GTGGTTGGT-
CALDENIA	GCCCCCATCG	CGGGCATAGC	AGATGATGGC	CTCCCGAGAG	CC-TTGACTT	GAGGCCGGC-
NIGRA	GCCCCCATCG	CGGGCACGAC	AGATGATTGC	CTCCCGAGAG	CC-TTGACTC	GTGGCCGGC-
AFFINIS	GCCCCCATCG	CGGGCATGGC	GGATGATGGC	CTCCCGAGAA	CC-TTGACTT	GTGGTCGGC-
ALBA	GCCCCCATCA	CGGGCACGAC	GGATGATGGC	CTCCCGAGAG	CC-TTGACTC	GCGGCCGGC-
VINALILLO	GCCCCCATCG	CGGGCATGGC	AGATGATATC	ATCCCGTGAT	CA-GTGCTT	GAGTTCGGC-
GLANDULOSA	GCCCCCATCG	CGGGCACGAC	AGATGATTGC	CTCCCGAGAG	CC-TTGACTC	GTGGCCGGC-
RUSCIFOLIA	GCCCCCATCG	CGGGCATGGC	AGATGATTTC	CTCCCGTGAT	CC-TTGACTT	GAGTTCGGC-
ALPATACO	GCCCCCATCG	CGGGCACGAC	GGATGATGGC	CTCCCGAGAG	CC-TTGACTC	ATGGCCGGC-
VELUTINA	GCCCCCATCG	CGGGCACGAC	AGATGATGGC	CTCCCGAGAG	CC-TTGACTC	GTGGCCGGC-
KUNTZEI	GCCCCCATCA	CAGGCACAGT	GGATGATGGT	CTCTGAGAA	CC-TCGATTA	GCGACCCATT
FLEXUOSA	GCCCCATTG	CGGGCACGAC	AGATGATTGC	CTCCCGAGAG	CC-TTGACTC	ATAGCCGGT-
ARGENTINA	GCCCCCATCA	CGGGCATGCC	GAATGATGGC	CTCTGTGAG	CC-TTGACTT	TCGCCCGGC-
REPTANS	GCCCCCATCA	CCGGCATAAC	AGATGATGGC	CTCCCGAGAG	CC-TTGACTT	GTGACCCGT-

VULGARIS	TGAAAAAGCAA	GTTCGGGGCG	GAGTCCCCCA	CGATA-ACGG	TGGATGAGCC	CA-13----C
CALDENIA	CCAATCAAGG	GCCCGAAGTG	ATGGCGGCCA	CGATCCACGG	TGGATGA-TG	AATGAGATGT
NIGRA	CGAAAAAAGA	GCCCGAAGTG	ACGGTGGCCA	CGATCCACGA	TGGATGA-TG	AATGAGATGC
AFFINIS	CGAAAAAAGG	GCCCGAAGTG	ACGGCGGCCA	CGATCCACGA	TGGATGAGTG	AATGAGATGC
ALBA	CGAATAAAGG	GCCTCGAAGTG	ACGGCGGCCA	CGATCCACGG	TGGATGAGTG	AATGAGATGC
VINALILLO	CCAACCAAGA	GCCGGAAGTG	ATGGCGGCCA	CGATCCACAA	TGGATGAGTG	AATGAGATGC
GLANDULOSA	CGAAAAAAGA	GCCCGAAGTG	ACGGCGGCCA	CGATCCACGA	TGGATGAGTG	AATGAGATGC
RUSCIFOLIA	CCAACCAAGA	GCCGGAAGTG	ACGGCGGCCA	CGATCCACGG	TGGATGA-TG	AATGAGATGC
ALPATACO	CGAATAAAGG	GCNCGAAGTG	ACGGCGGCCA	CGATCCACGG	TGGATGAGTG	AATGAGATGC
VELUTINA	CGAATAAAGA	GCCCGAAGTG	ACGGCGGCCA	CGATCCACGA	TGGATGAGTG	AATGAGATGC
KUNTZEI	CGAAGAAAGG	GCCTGCAGTG	ACAGTGCCCA	CGATCCACGC	TGGATGAGTG	AATGAGATGC
FLEXUOSA	CGAAAAAAGA	GCCCGAAGTG	ACGGCGGCCA	TGATCCACGA	TGGATGAGTG	AATGAGATGC
ARGENTINA	TGAAAGAAGG	GCCCAAAGTG	ACGGCGGCC	CGATCCACAG	TGGATGAGTG	AACGAGATAT
REPTANS	CGAAAAAAGA	GCCCGGAATG	ACGGCGGCCA	CGATCCACGA	TGGATGAGTG	AATGAGAAGC

VULGARIS	GCTCGAG14A	CCAATCGTGC	CTGTG-GGAC	TCCGACGTAA	CGGACTTATC	GACCCACAC
CALDENIA	GCTTGAGAGA	CCAGACGTGC	ACGCGTCGTC	TCACAAAGAA	GGGGCCTCAT	G---ATGAGG
NIGRA	GCTCGAGAGA	CCAGACGTGC	GCGCGTCGTC	GCGCAAGAA	GGGGCCTCAT	G-15ATGAGG
AFFINIS	GCTCGAGAGA	CCAGACGTGC	ACGCGTCGTC	GCGCAAGAA	GGGGCCTCAT	G---ATGAGG
ALBA	GCTTGAGAGA	CCGGACGTGC	GCGCGTCGTC	GTACAGAGAA	GGGGCCTCAC	G---ATGAGG
VINALILLO	GCTTGAGAGA	CCAGATGTGC	ACGCGTCGTC	TCACAAAGAA	GGGGCCTCAT	G---ATGAGG
GLANDULOSA	GCTCGAGAGA	CCAGACGTGC	GCGCGTCGTC	GCGCAAGAA	GGGGCCTCAT	G---ATGAGG
RUSCIFOLIA	GCTTGAGAGA	CCAGATGTGC	ACGCGTCGTC	TCGCAAGAA	GGGGCCTCAT	G---ATGAGG
ALPATACO	GCTTGAGAGA	CCGGACGTGC	GCGCGTCGTC	ACACAAAGAA	GGGGCCTCAT	G---ATGAGG
VELUTINA	GCTTGAGAGA	CCAGACGTGC	GCGCGTCGTC	GCGCAAGAA	GGGGCCTCAT	G---ATGAGG
KUNTZEI	GCTCGAGAGA	TTACACGTAC	GAGCATCGTC	TTCTAAAGAA	GGGGTCTCAC	G---ATGAGG
FLEXUOSA	GCTCGAGAGA	CCAGACGTGC	GCGTGTGTT	GTGCAAGAA	GGGGCTTCAT	G---ATGAGG
ARGENTINA	GCTCGAGAGA	CCGGACATGT	GCGTTTTTTG	GCACAAAGGA	GGGGCCTCAC	A---ATGAGG
REPTANS	GGTTGAGAGA	CCAAAAGTGC	GGGCGTTGTT	GCTCGAAGAA	GGGGCTTCAT	GG--ATGAGG

VULGARIS	GCGCCC-TCT	GTGCAAACCG	AGTGTGCCAT	CTAC16-
CALDENIA	GCTCCC-TCA	ACAGGGAGAA	AA-GCCCATG	ACACGTA
NIGRA	GCTCCC-TCA	ACAGGGAGAA	AA-GCCCATG	ACGTA17
AFFINIS	GCTCCC-TCA	ACAGGGAGAA	AA-GCCCATG	ACACGTA
ALBA	GCTCCC-TCG	ACAGGGAGAA	AA-GCCCATG	ACACGTA
VINALILLO	GCTCCCTCA	ACGGGGAGAA	AA-GCCCATG	ACATGTA
GLANDULOSA	GCTCCC-TCA	ACAGGGAGAA	AA-GCCCATG	ACACGTA
RUSCIFOLIA	GCTCCCTTCA	ACGGGGAGAA	AA-GCCCATG	ACATGTA
ALPATACO	GCTCCC-TCA	ACAGGGAGAA	AA-GCCCATG	ACACGTA
VELUTINA	GCTCCC-TCG	ACAGGGAGAA	AA-GCCCATG	ACACGTA
KUNTZEI	GCTCCC-TCG	A-AGGGGAGG	AA-GCTCAGG	ACACGTA
FLEXUOSA	GCTCCC-TCA	ACAGGGAGAA	AA-GCCCATG	ACACGTA
ARGENTINA	GCTCCCTCGA	ACAGGGAGAA	AAAGCCCAGG	ACACGTA
REPTANS	GCTTCC-TTA	ACAGGGGAGA	AA-GCCCATG	ACACGTA

Bibliografía

- Achi OK. 1992. Microorganisms associated with natural fermentation of *Prosopis africana* seeds for the production of okpiye. *Plant Foods human Nutrition* 42:297-304.
- Adámoli J. 1973. Frecuencias, confinamiento y transgresividad en especies del Chaco argentino. *Bol. Soc. Arg de Bot.* XV: 1-11.
- Anderberg AA, T Trif, & M Kallersjo. 2000. Phylogeny of *Cyclamen* L. (*Primula*): Evidence from morphology and sequence data from the internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA. *Plant Syst Evol.* 220:147-160.
- Arrheim N, M Krystal, R Schmickel, G Wilson, O Ryder & E Zimmer. 1980. Molecular evidence for genetic exchanges among ribosomal genes on nonhomologous chromosomes in man and apes. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 77:7323-7327.
- Avice JC. 1994. Molecular markers, natural history and evolution. Chapman & Hall, New York. USA.
- Avice JC. 1975. Systematic value of electrophoretic data. *Syst. Zool.* 23:465-481.
- Axelroad DI. 1950. Studies in Late Tertiary Paleobotany. VI. Evolution of Desert Vegetation in Western North America pp 215-306. Carnegie Inst. Wash. Pub. 590. 323 pp.
- Ayala FJ, ML Tracey, D Hedgecock & RC Richmond. 1974. Genetic differentiation during the speciation process in *Drosophila*. *Evolution* 28: 576 - 592.
- Balakirev ES, EI Balakirev, F Rodriguez-Trelles & FJ Ayala. 1999. Molecular evolution of two linked genes, *Est-6* and *Sod*, in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 153(3):1357-1369.
- Baldwin BG, MJ Sanderson, JM Porter, MF Wojciechowshi, CS Campbell & MJ Donoghue. 1995. The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 82:247-277.
- Barbour M. 1969. Patterns of genetic similarity between *Larrea divaricata* of North and South America. *Amer. Midl. Naturalist* 81:54-67 citado en Solbrig OT. 1972. The floristic disjunction between the "monte" in Argentina and the "Sonoran desert" in Mexico and the United States. *Ann Missouri Botanical Garden* 59(2):218-223
- Bayer RJ, CF Puttock & SA Kelchner. 2000. Phylogeny of South African Gnaphalieae (*Asteraceae*) based on two non coding chloroplast sequences. *American Journal of Botany* 87(2):259-272.
- Berry A & M Kreitman. 1993. Molecular analysis of an allozyme cline: Alcohol Dehydrogenase in *Drosophila melanogaster* on the east coast of North America. *Genetics* 134(3): 869-893.
- Bessegga C. 1997. Estudios isoenzimáticos en especies Americanas del Género *Prosopis* (*Leguminosae*). Tesis de Licenciatura. FCEyN. U.B.A.
- Bessegga C, BO Saidman & JC Vilardi. 2000A. Isozyme and RAPD Studies in *Prosopis glandulosa* and *P. velutina* (*Leguminosae*, *Mimosoideae*). *Genetics and Molecular Biology* 23(3):1-5.
- Bessegga C, L Ferreyra, BO Saidman & JC Vilardi. 2000B. Unexpected low genetic differentiation among allopatric species of section *Algarobia* of *Prosopis* (*Leguminosae*). *Genetica*. 109:255-266
- Bessegga C, LI Ferreyra, N Julio, S Montoya, BO Saidman & JC Vilardi. 2000C. Mating system parameters in species of genus *Prosopis* (*Leguminosae*). *Hereditas* 132:19-27.
- Black IV WC. 1996. FORTRAN programs for the analysis of RAPD-PCR markers in populations. Colorado State University, Ft. Collins, CO 80523.
- Bossart JL & DP Pashley-Powell. 1998. Genetic estimates of population structure and gene flow: limitations, lessons and new directions. *TREE* (13):202-206.

- Brettin TS, R Karle, EL Crowe & AF Lezzoni. 2000. Chloroplast inheritance and DNA variation in sweet, sour and ground cherry. *The journal of Heredity* 91(1):75-79.
- Brown AHD. 1979. Enzyme polymorphism in plant population. *Theor. Pop. Biol.* 15: 1-42
- Brown AHD. 1990. Genetic characterization of plant mating systems. En: *Plant populations genetics, breeding and genetic resources*. Brown AHD, Clegg M, Kahler AL y Weir B (eds). pp: 145-162. Sinauer Associates Inc. Publishers. Sunderland. Massachussetts.
- Brown AHD & RW Allard. 1970. Estimation of the mating system in open-pollinated maize populations using isozyme polymorphisms. *Genetics* 66:133 - 145.
- Brown AHD, SCH Barret & GF Moran. 1985. Mating system estimation in forest trees: models, methods, and meanings. En: Gregorious HK (ed). *Population genetics in forestry. Lecture Notes in Biomathematics* 60. SpringerBerlin Heidelberg. NewYork pp32.
- Buckler ES & TP Holtsford. 1996. Zea systematics: ribosomal ITS evidence. *Mol. Biol. Evol.* 13:612-622.
- Burghardt AD. 1995A. Aproximación del análisis quimiosistemático en la delimitación de especies de plantas. *Mendeliana* 12(1): 19-24.
- Burghardt AD. 1995B. La identidad de 4 especies de *Prosopis* L. expresada a través de sus patrones electroforéticos. *Mendeliana* 12(1):38-50.
- Burghardt AD. 2000A. Estudio electroforético de proteínas de semilla en *Prosopis* (Leguminosae) I: Sección Algarobia. *Bol. Soc. Argent. Bot.* 35(1-2):137-147.
- Burghardt AD. 2000B. Estudio electroforético de proteínas de semilla en *Prosopis* (Leguminosae) II: Sección Strobocarpa. *Bol. Soc. Argent. Bot.* 35(1-2):149-156.
- Burghardt AD & RA Palacios. 1991. Estudio electroforético en cuatro especies del género *Prosopis* (Leguminosae). *Bol. Soc. Argent. Bot.* 27(1): 43-48.
- Burghardt AD & RA Palacios. 1996. La variación electroforética como herramienta para la conservación de germoplasma y su aprovechamiento en el género *Prosopis* (Leguminosae). *Actas Simposio Internacional Forestación y Silvicultura en Zonas Áridas y Semiáridas (Chile)* Publicado en medio electrónico.
- Burghardt AD, Espert SM & Palacios RA. 2001. La electroforesis de proteínas seminales como evidencia del origen híbrido de *Prosopis abbreviata* Benth. (Mimosaceae). XXX Congreso Argentino de Genética: 137.
- Burkart A. 1937A. Una nueva especie de *Prosopis* del Monte occidental Argentino. *Revista Argentina de Agronomía* 4:39-42.
- Burkart A. 1937B. Estudios morfológicos y etológicos en el Género *Prosopis*. *Darwiniana* 3: 27-59.
- Burkart A. 1952. *Las Leguminosas argentinas*. Editorial Acme, Buenos Aires.
- Burkart A. 1976. A monograph of the genus *Prosopis* (Leguminosae subfam. Mimosoidae). *Journal Arnold Arboretum* 57: 219 - 525
- Cabrera AL. 1976. Regiones Fitogeográficas Argentinas. *Enciclopedia Argentina de Agricultura y Jardinería, Segunda Edición, Tomo II, Fascículo 1*, Editorial ACME S.A.C.I. pp 85.
- Carman NJ & TJ Mabry. 1975. Disjunction of *Prosopis* reptans and the origin of the North american populations. *Biochemical systematics*. 3:19-23.
- Catalán L, C Carranza, L Gonzalez, U Karli & M Ledesma. 1994. Afforestation trials with *Prosopis chilensis* (Mol) Stuntz y *Prosopis flexuosa* D.C. in the dry Chaco, Argentina. *Forest Ecology and Management* 70 (1-3): 113-119.
- Cavalli-Sforza LL & WF Edwards. 1967. Phylogenetic analysis: models and estimations procedures. *Am. J. Hum. Genet.* 19:233-257.

- Cedergren R, MW Gray, Y Abel & D Sankoff. 1988. The evolutionary relationships among known life forms. *J. Mol. Evol.* 28:98-112.
- Clark A G & TS Whittam. 1992 Sequencing errors and molecular evolutionary analysis. *Molecular Biology and Evolution* 9:744-752.
- Clegg M. 1980. Measuring plant mating systems. *Bioscience* 30: 814-818.
- Cony M. 1993. Reforestación racional de zonas áridas y semiáridas con árboles de múltiples propósitos. *Interciencia* 20: 249-253.
- Dellaporta SL, J Wood & JB Hicks. 1983. A Plant DNA miniprep: Version II. *Plant Molecular Biol. Report* 1: 19-21.
- Demesure B, N Sodji & RJ Petit. 1995. A set of universal primers for amplification of polymorphic non-coding regions of mitochondrial and chloroplast DNA in plants. *Molecular Ecology* 4:129-131.
- Doliguez A & H Joly. 1997. Mating system of *Carapa procera* (Meliaceae) in the French Guiana Tropical forest. *American Journal of Botany* 84: 461 - 470.
- Eanes WF, M Kirchner & J Yoon. 1993. Evidence for adaptative evolution of the *G6pd* gene in *Drosophila melanogaster* and *Drosophila simulans* lineages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90(16):7475-7479.
- Eanes WF, M Kirchner, J Yoon, CH Biermann. 1996. Historical selection, aminoacid polymorphism and lineage-specific divergence at the *G6pd* locus in *Drosophila melanogaster* and *D. simulans*. *Genetics* 144(3):1027-1041.
- Eck RV & MO DayHoff. 1966. Atlas of Protein sequence and Structure. Natl Biomed. Res. Found., Washington, CD citado en Li WH. 1997. *Molecular Evolution*. pp: 112. Sinauer Associates, Inc. Publishers. Sunderland Massachusetts, USA.
- Farris JS. 1983. The logical basis of phylogenetic analysis. En: *Advance in Cladistics 2. Proceeding of the Second Meeting of the Willi Hennig Society*. Platnick, N. And V. Funks (eds). pp: 7-36. Columbia University Press. citado en Goloboff PA. 1998. *Principios Básicos de Cladística*. Sociedad Argentina de Botánica. Argentina.
- Farris JS. 1989. The retention index and the rescaled consistency index. *Cladistics* 5:417-419.
- Felker P. 1982. Uses of mesquite wood in Argentina and possibilities for genetic selection to provide straight fast-growing mesquite. En: P. Felker and S. Robertson (eds) *Mesquite Woodworking*. pp: 33-35. Caesar Kleber Wildlife Research Institute, Kingville, TX.
- Felsenstein J. 1973. Maximum Likelihood and Minimum-Steps Methods for estimating evolutionary trees from data on discrete characters. *Syst Zool.* 22: 240-249
- Felsenstein J. 1981. Evolutionary trees from sequences: A maximum likelihood approach. *J. Mol. Evol.* 17:368-376.
- Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution.* 39:783-791.
- Felsenstein J. 1988. Phylogeny from molecular sequences. Inference and reliability. *Annu Rev. Genet.* 22:521-565.
- Felsenstein J. 1993. PHYLIP (Phylogeny Inference Package).v. 3.5c, Department of Genetics, The University of Washington. Seattle, WA.
- Fernandez Lima PC. 1990. Informe técnico final sobre proyecto *Prosopis*. Proyecto realizado por EMBRAPA, CNPF y CPATSA. 65 pp.
- Ferreira L. 2001. Estudio de la variabilidad y la diferenciación genética por medio de técnicas de isoenzimas y RAPD en poblaciones naturales de especies e híbridos del Género

- Prosopis* (Leguminosae, Mimosoidae). Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas, Universidad de Buenos Aires.
- Fitch WM. 1977. On the problem of discovering the most parsimonious tree. *Am. Nat.* 111:223-257.
- Fitch WM & E Margoliash. 1967. Construction of phylogenetic trees. A method based on mutation distances as estimated from Cytochrome C sequences is of general applicability. *Science* 155:279-284.
- Franceschinelli EV & KS Bawa. 2000. The effect of ecological factors on the mating system of a South American shrub species (*Helicteres brevispira*). *Heredity* 84: 116-123.
- Galera FM, M Trevisson & S Bruno. 1992. *Prosopis* in Argentina: Initial results on cultivation in green house and orchards and pods quality for food or feed of five native *Prosopis* species of Cordoba province. En: *Prosopis* species. CORD: 145-156. University of Durham, UK.
- Galindo-Almanza S, E Garcia Moya, TL Wendt & FV Gonzalez Cossio. 1992. Potencial de hibridación natural en el mesquite (*Prosopis laevigata* y *P. glandulosa* var. *torreyana*, Leguminosae) de la altiplanicie de San Luis Potosí. *Acta Botánica Mexicana* 20:101-117.
- Gaut BS & MT Clegg. 1993. Molecular evolution of the Adh-1 locus in the genus *Zea*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90:5095-5099.
- Genisse J, RA Palacios, PS Hoc, R Carrizo, L Moffat, MP Mom, MA Agullo, P Picca & S Torregosa, 1990. Observaciones sobre la biología floral de *Prosopis* (Leguminosae, Mimosoidae). II Fases florales y visitantes en el distrito Chaqueño Serrano. *Darwiniana* 30: 71 - 85.
- Gibson JP & JL Hamrick. 1991. Heterogeneity in pollen allele frequencies among cones, whorls and trees of table mountain pine (*Pinus pungens*). *American Journal of Botany* 1214-1221.
- Gielly L & P Taberlet. 1994. The use of Chloroplast DNA to resolve plant phylogenies: non coding vs. rbcL sequences. *Molecular Biology and Evolution*: 11-769-777.
- Gielly L & P Taberlet. 1996. A phylogeny of European gentians inferred from chloroplast trnL(UAA) intron sequences. *Botanical Journal of The Linnean Society.* 120:57-75.
- Giovannovi SJ, JS Turner, GJ Olsen, S Barns, DJ Lane & NR Pace. 1988. Evolutionary relationships among cyanobacteria and green chloroplasts. *J. Bacteriol.* 170:3584-3592.
- Godt MJW & JL Hamrick. 1991. Estimates of outcrossing rate in *Lathyrus latifolius* populations. *Genome* 34:988-992.
- Godt MJW & JL Hamrick. 1993. Patterns and levels of pollen mediated gene flow in *Lathyrus latifolius*. *Evolution* 47(1):98-110.
- Goloboff PA. 1998. Principios Básicos de Cladística. Sociedad Argentina de Botánica. Argentina.
- Grant V. 1989. Especiación vegetal. Noriega Editores. Versión española. 587 pp.
- Hamilton MB & T Mitchell-Odds. 1994. The mating system and relative performance of selfed and outcrossed progeny in *Arabis fecunda* (Brassicaceae). *American Journal of Botany* 8:1252-1256.
- Hamrick JL & MD Loveless. 1986. Associations between the breeding system and the genetic structure of tropical tree populations. En: J. Brock & YB Linhart (eds). *Evolutionary Ecology of Plants*. Westview Press. Boulder.
- Hamrick JL y MD Loveless. 1989. Associations between the breeding system and the genetic structure of tropical tree populations. En: *Evolutionary Ecology of Plants*. J. Bock and Y. B. Linhart (eds). Westview Press. Boulder, C.O. citado en Hamrick 1990. Isozymes

- and the analysis of genetic structure in plant populations En: Isozyme in plant Biology. Soltis DE y PS Soltis (eds). Advance in Plants Sciences Series, vol 4:87-103.
- Hamrick JL, DA Murawski & JD Nason. 1993. The influence of seed dispersal mechanisms on the genetic structure of tropical tree populations. *Vegetatio* 107/108: 281-297.
- Hao G, RMK Saunders & ML Chye. 2000. A phylogenetic analysis of the Illiaceae based on sequences of internal transcribed spacers (ITS) of nuclear ribosomal DNA, *Plant Syst. Evol* 223:81-90.
- Hardig TM & PS Soltis. 1999. An ITS based phylogeny analysis of the Euryptera species group in *Lomatium* (Apiaceae). *Plant Syst. Evol.* 219:65-78.
- Hardig TM, PS Soltis & DE Soltis. 2000. Diversification of the North American shrub genus *Ceanothus* (Rhamnaceae): conflicting phylogenies from nuclear ribosomal DNA and chloroplast DNA. *American Journal of Botany* 87(1): 108-123.
- Harrison RG. 1991. Molecular changes at speciation. *Annual Review of Ecology and Systematics* 22:281-308.
- Hedrick PW. 1983. Genetics of populations. S. Lipsett Eds. Science Books International Inc.
- Hedrick PW. 1990. Mating system and evolutionary genetics. En: Population Biology. Wöhrman K, SK Jain (eds). pp: 83-114. Springer-Verlag Berlin. Heidelberg New York.
- Hillis DM & MT Dixon. 1991. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. *Quarterly Review Biology* 66:411-453 citado en Soltis DE y PS Soltis. 1998. Choosing an approach and an appropriate gene for phylogenetic analysis pp: 1-42. En: 1998. *Molecular Systematics of Plants II. DNA sequencing*. Soltis DE, Soltis PS y Doyle JJ (eds). Chapman & Hall, New York.
- Hudson RR, K Bailey, D Skarecky, J Kwiatowski & FJ Ayala. 1994: Evidence for positive selection in the superoxide dismutase (*Sod*) region of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 136: 4 1329-40.
- Hunziker JH, CA Naranjo, RA Palacios, L Poggio & BO Saidman. 1986. Studies on the taxonomy, genetic variation and biochemistry of Argentine species of *Prosopis*. *Forest Ecology and Management* 16(1-4): 301-315.
- Hunziker JH, RA Palacios, L Poggio, CA Naranjo & TW Yang. 1977. Geographic distribution, morphology, hybridization, cytogenetics and evolution, pp 10-47 in *Creosote Bush. Biology and Chemistry of Larrea in New World deserts*, edited by T.J. Mabry, J.H. Hunziker and D.R. Difeo. US/IBP Synthesis Series N. 6, Dowden, Hutchinson and Ross, Inc.
- Husband BC & DW Shemske. 1995. Magnitude and timing of inbreeding depression in a diploid population of *Epilobium angustifolium* (Onograceae). *Heredity* 75:206-215.
- Hutchinson DW & AR Templeton. 1999. Correlation of pairwise genetic and geographic distance measures: inferring the relative influences of gene flow and drift on the distribution of genetic variability. *Evolution* 53(6):1898-1914.
- Jansen RK, JL Wee & D Millie. 1998. Comparative utility of chloroplast DNA restriction site and DNA sequence data for phylogenetic studies in plants. En: *Molecular Systematics of Plants II. DNA sequencing*. Soltis DE, Soltis PS y Doyle JJ (eds). pp: 87-100. Chapman & Hall, New York.
- Johnston MO. 1992. Effects of cross and self fertilization on progeny fitness in *Lobelia cardinalis* and *L. siphilitica*. *Evolution* 46:688-702.
- Julio NB. 2000. Estudios alozímicos sobre variabilidad, estructura y diferenciación genética en *Prosopis chilensis* (Leguminosae, Mimosoideae) y especies relacionadas. Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional de Córdoba.

- Karlin U & R Diaz. 1988A. Otros posibles usos. En: *Prosopis* en la Argentina. Documento preliminar elaborado para el Primer Taller Internacional sobre recursos genéticos y Conservación de Germoplasma de *Prosopis*. pp: 237. FAO, FCA-UNC y FCEyN-UBA.
- Karlin U & R Diaz. 1988B. Sistemas agroforestales En: *Prosopis* en la Argentina. Documento preliminar elaborado para el Primer Taller Internacional sobre recursos genéticos y Conservación de Germoplasma de *Prosopis*. pp: 235. FAO, FCA-UNC y FCEyN-UBA.
- Keys RN & S Smith S. 1994. Mating system parameters and population genetic structure in pioneer populations of *Prosopis velutina* (Leguminosae). *American journal of Botany* 81: 1013 - 1020.
- Kimura M. 1980. A simply method for estimating evolutionary rates of base substitution through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* 16:111-120.
- Kittelson PM & JL Maron. 2000. Outcrossing rate and inbreeding depression in the perennial yellow bush lupine, *Lupinus arboreus* (Fabaceae). *American Journal of Botany* 87(5): 652-660.
- Kludge AG & JS Farris. 1969. Quantitative phyletics and the evolution of annurans.- *Syst Zool* 18: 1-32.
- Krueger SK & SJ Knapp. 1991. Mating system of *Cuphea laminuligera* and *Culpea lutea*. *Theoretical Applied Genetics* 82: 221-226.
- Latta R & K Ritland. 1994. The relationships between inbreeding depression and prior inbreeding among populations of four *Mimulus* taxa. *Evolution* 48:806-817.
- Leskinen E & A Alstrom-Rapaport. 1999. Molecular phylogeny of Salicaceae and closely related Flacourtiaceae evidence from 5.8S, ITS1 and ITS2 of the rDNA. *Plant Syst. Evol* 215:209-227.
- Levy F, J Antonovics, JE Boynton & NW Gillham. 1996. A population genetic analysis of chloroplast DNA un *Phacelia*. *Heredity* 76:143-155.
- Li CC & DG Horvitz. 1953. Some methods of estimating the breeding coeficient. *Amer. J. Hum. Gen.* 95: 107-117.
- Li WH. 1997. *Molecular Evolution*. Sinauer Associates, Inc. Publishers. Sunderland Massachusetts, USA.
- Lia VV, VA Confalonieri, CI Comas & JH Hunziker. 2001. Molecular phlogeny of *Larrea* and its allies (Zygophyllaceae): reticulate evolution and probable time of creosote bush arrival to North America. *Molecular Phylogenetics and evolution*. In press.
- Lockhart PJ, MA Steel, MD Hendy & D Penny. 1994. Recovering evolutionary trees under a more realistic model of sequence evolution. *Mol. Biol. Evol.* 11:605-612.
- Loveless MD y JL Hamrick. 1984. Ecological determinants of genetics structure in plant populations. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 15:65-95.
- Lynch M. & BG Milligan. 1994. Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Molecular Ecology* 3: 31-99.
- Maniatis T, EF Fritsch & J Sambrook, 1982. *Molecular cloning a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Publications, Cold Spring Harbor.
- Mantel N. 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Res* 27: 209-220.
- Mason-Gamer RJ, KE Hollsinger & RK Jansen. 1995. Chloroplast DNA haplotype variation within and among populations of *Coreopsis grandiflora* (Asteraceae). *Mol. Biol. Evol.* 12:371-381.
- MLTR. Dr. Kermit Ritland, Department of Forest Sciences, University of British Columbia.

- Montoya S, BO Saidman, JC Vilardi & C Bessega. 1994. Diferenciación y flujo genético entre especies de la Sección Algarobia, Género *Prosopis* (Leguminosae). XXIV Congreso de la Sociedad Argentina de Genética: 17.
- Moran GF, O Muona & JC Bell. 1989. Breeding systems and genetic diversity in *Acacia auriculiformis* and *A. crassicarpa*. *Biotropica* 21(3): 250-256.
- Morello J, N Crudeli & M Saraceno. 1971. Los vinales de Formosa (Rep. Argentina). La colonizadora leñosa *Prosopis ruscifolia* Gris. Serie fitogeográfica N° 11. INTA.
- Morgante M, Vendramin GG & AM Olivieri. 1991. Mating system analysis in *Pinus leucodermis* Ant., detection of self-fertilization in natural populations. *Heredity* 67: 197-203.
- Morgensen HL. 1996. The hows and whys of cytoplasmic inheritance in seed plants. *American Journal of Botany* 83(3):383-404.
- Murawski DA & JL Hamrick. 1991. The effect of the density of flowering individuals on the mating system of nine tropical tree species. *Heredity* 67:167-174.
- Neff JL, BB Simpson & AR Moldenke. 1977. Flowers-flower visitor system. En: *Convergent evolution in warm deserts*. GH Orians y OT Solbrig (eds). Series Ch6:204-223. US/IBP Synthesis Dowden Hutchinson and Ross, Stroudsburg.
- Nei M. 1972. Genetic distances between populations. *Am. Nat.* 106: 283-292
- Nei M. 1975. *Molecular Population Genetics and Evolution*. North-Holland, Amsterdam.
- Nei M. 1977. F statistics and analysis of gene diversity in subdivided populations. *Ann. Hum. Genet.* 225-233.
- Nei M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small numbers of individuals. *Genetics* 89: 583-590.
- Nei M. 1987. *Molecular Evolutionary genetics*. Columbia University Press, New York.
- Nei M & RK Chesser. 1983. Estimation of fixation indices and gene diversity. *Annals Human Genetics* 47: 253 - 259.
- Neigel JE. 1997. A comparison of alternative strategies for estimating gene flow from genetic markers. *Annu Rev, Ecol. Syst.* 28 (105-128).
- Neigel JE & JC Avise. 1986. Phylogenetic relationships of mitochondrial DNA under various demographic models of speciation. En: Karlin S y E Nevo (eds). *Evolutionary Processes and Theory*. Academic Press, New York, USA citada en Smith JF. 2000. Phylogenetic signal common to three data sets: combining data with initially appear heterogeneous. *Plant Syst. Evol.* 221:179-198.
- Nevo E. 2001. Evolution of genome-phenome diversity under environmental stress. *PNAS*. 98(11):6233-6240
- Noyes RD. 2000. Biogeographical and evolutionary insights on *Erigeron* and allies (Asteraceae) from ITS sequence data. *Plant Syst. Evol.* 220:93-114.
- Ohara M, H Takeda, Y Ohno & Y Shimamoto. 1996. Variations in the breeding system and the population genetic structure of *Trillium kamtschaticum* (Liliaceae). *Heredity* 76: 476-484.
- Ohta T. 1982. Linkage disequilibrium due to random genetic drift in finite subdivided populations. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 79:1940-1944.
- Palacios RA & ID Bravo. 1981. Hibridación natural en *Prosopis* (Leguminosae) en la Región Chaqueña Argentina. Evidencias morfológicas y cromatográficas. *Darwiniana* 23: 3-35.
- Palacios RA, MM Brizuela, AD Burghardt, EM Zalochi & MP Mom. 1991. *Prosopis burkartii* and its possible hybrid origin. *Bull of the International group for the study of Mimosoidae*. 19: 146-161.
- Palmer JD 1987. Chloroplast DNA evolution and Biosystematic uses of DNA variation. *Am. Nat.* 130:6-29.

- Pamilo P & M Nei. 1988. Relationships between gene trees and species trees. *Molecular Biol. Evol.* 5:568-583.
- Peackock JT & C McMillan. 1965. Ecotypic differentiation in *Prosopis* (Mesquite). *Ecology* 46(1-2):35-51
- Petit RJ, Demesure B & S Dumolin. 1998. cpDNA and mtDNA primers in plants. *Molecular tools for screening biodiversity*. A. Karp, Isaac PG, DS Ingram (eds). Chapman & Hall, London. ISBN 63830 4.
- Pocoví MI. 1992. Estudios isoenzimáticos en especies de *Prosopis* (Leguminosae, subf. Mimosoidae). Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Naturales. Universidad Nacional de Salta.
- Prémoli A. 1996. Allozyme polymorphisms, outcrossing rates, and hibridization of South American *Nothophagus*. *Genetica* 97: 55 - 64.
- Ramirez L, A. De La Vega, N Razkin, V Luna & PJC Harris. 1999. Analysis of the relationships between species of the genus *Prosopis* revealed by the use of molecular markers. *Agronomie* 19: 31-43.
- Raven PH. 1963. Anphitropical relationships in the floras of North and South America. *America Quart. Rev. Biol.* 38:151-177.
- Raymond M & F Rousset. 1995. GENEPOP (version 1.2): Population genetics software for exact tests and ecumenism. *Journal of Heredity* 86: 248-249
- Reboud X & C Zeyl. 1994. Organelle inheritance in plants. *Heredity* 72:132-140.
- Richardson JE, MF Fay, QCB Cronk, D Bowman & MW Chase. 2000. A phylogenetic analysis of Rhamnaceae using *rbcl* and *TrnL-F* plastid DNA sequences. *American Journal of Botany* 87(9): 1309-1324.
- Rieserberg LH & DE Soltis. 1991. Phylogenetics consequences of cytoplasmatic gene flow in plants. *Evolutionary Trends in Plants* 5:65-84.
- Rieserberg LH & SJ Brunsfeld. 1992. Molecular evidence and plant introgression. En: PS Soltis, DE Soltis and DJ Doyle (eds). *Molecular systematics of plants*, 151-176. Chapman and Hall, New York, USA.
- Ritland K. 1989. Gene identity and the genetic demography of plants populations, pp. 181-199. En A Weir (ed.), *Population Genetics, Plant Breeding and Gene Conservation*. Sinauer, Sunderland, MA.
- Ritland K. 1990. Inferences about inbreeding depression based on changes of the inbreeding coefficient. *Evolution* 44(5): 1230-1241.
- Roig FA. 1993. Aportes a la Etnobotánica del Género *Prosopis*. En: *Contribuciones Mendocinas a la quinta Reunión Regional para América Latina y el Caribe de la Red de Forestación del CIID*. pp: 99-121. Unidades de Botánica y Fisiología vegetal. IADIZA.
- Saidman BO. 1985. Estudio de la variación alozímica en el género *Prosopis*. Tesis Doctoral, Facultad Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.
- Saidman BO. 1986. Isoenzymatic studies of Alcohol Dehydrogenase and Glutamate Oxalacetate Transaminase in four Southamerican species of *Prosopis* and their natural hybrids. *Silvae genetica* 35: 3-10.
- Saidman BO. 1988. La electroforesis de isoenzimas para la medición de la variabilidad genética en especies de *Prosopis*. En: *Prosopis en Argentina*. Documento preliminar elaborado para el I Taller Internacional sobre Recurso Genético y Conservación de Germoplasma en *Prosopis*. pp: 107-118. Fac. Cs. Agrarias (U. N. Córdoba) - FAO - PIRB.
- Saidman BO. 1990. Isozyme studies on hybrid swarms of *Prosopis caldenia* and sympatric species. *Silvae Genetica* 39:5-8.

- Saidman BO. 1993. Las isoenzimas en el estudio de la variación genética y las afinidades entre especies de *Prosopis*. Bol. Genét. Inst. Fitotéc. Castelar 16: 25-37.
- Saidman BO & JC Vilardi. 1987. Analysis of the genetic similarities among seven species of *Prosopis* (Leguminosae : Mimosoideae). Theoretical Applied Genetics 75: 109-116.
- Saidman BO & JC Vilardi. 1993. Genetic variability and germplasm conservation in the genus *Prosopis*. En: Puri, S. (ed). Nursery Technology of Forest Tree Species of Arid and Semiarid Regions. pp. 187-198. Winrock-oxford & IBH Publishing Co. PVT. LTD., New Delhi, Bombay, Calcuta.
- Saidman BO, JC Vilardi, MI Pocoví & N Acreche. 1996. Isozyme studies in Argentine species of the Section Strombocarpa, Genus *Prosopis* (Leguminosae). J. Genetics 75: 139-149.
- Saidman BO, JC Vilardi, S Montoya & L Paggia. 1997. Genetic Variability and Plaidy level in species of *Prosopis* (Leguminosae). Bol. Soc. Argent Bot. 32(3-4):217-225.
- Saidman BO, C Bessega, L Ferreyra & JC Vilardi. 1998A. Random amplified polymorphic DNA (RAPDs) variation in hybrid swarms and pure populations of genus *Prosopis*. En: Bruns, S., S. Mantell, C. Tragårdh & A. V. Viana (eds.) Recent Advances in Biotechnology for Tree Conservation and Management. pp: 122-134. International Foundation for Sciences. Stockholm. ISBN: 91 85798 460.
- Saidman BO, JC Vilardi, S Montoya, MJ Dieguez & HE Hopp. 1998B. Molecular markers: a tool for the understanding of the relationships among species of *Prosopis* (Leguminosae, mimosoidae). In: Puri, s. (Eds.). Tree Improvement: Applied Research and Technology Transfer. Science Publishers Inc. U. S. A. Ch 21: 311-324.
- Saitou N & M Nei. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogeny trees. Mol. Biol. Evol. 4:406-425.
- Samuel R, A Bachmair, J Jobst & F Ehrendorfer. 1998. ITS sequences from nuclear DNA suggest unexpected phylogenetic relationships between euro-mediterranean East Asiatic and North American taxa of *Quercus* (Fagaceae). Pl. Syst. Evol. 211:129-139.
- Schemske DW. 1983. Breeding system and habitat effects on fitness components in three neotropical *Costus* (Zingiberaceae). Evolution 37:523-539.
- Simmons MP & H Ochoterena. 2000. Gaps as characters in sequence-based phylogenetic analysis. Syst Biol. 49(2):369-381.
- Simpson BB. 1977. Breeding system of dominant perennial plants of two disjuncts warm desert ecosystems. Oecologia 27: 203-226.
- Simpson BB, JL Neff & AR Moldenke. 1977. *Prosopis* flowers as a resource. En: BB Simpson (ed). Mesquite: Its biology in two desert ecosystems, US/IBP synthesis Series Ch 5:84-107. Dowden Hutchinson and Ross, Stroudsburg.
- Slatkin M. 1985. Rare alleles as indicators of gene flow. Evolution 39:533-535.
- Smith JF. 2000. Phylogenetic signal common to three data sets: combining data witch initially appear heterogeneous. Plant Syst. Evol. 221:179-198.
- Sneath PHA & RR Sokal. 1973. Numerical taxonmomy. WH Freeman, San Fransisco.
- Sogin ML, HJ Elwood & JH Grunderson. 1986. Evolutionary diversity of eukaryotic small subunit rDNA genes. Proc. Natl. Acad Sci. USA 83:1383-1387.
- Sokal RR & CD Michener. 1958. A stathistical method for evaluating systematic relationships. University of Kansas Sci. Bull 28: 1409-1438 citado en Li WH. 1997. Molecular Evolution. pp:107. Sinauer Associates, Inc. Publishers. Sunderland Massachusetts, USA.
- Solbrig OT. 1972. The floristic disjunction between the "monte" in Argentina and the "Sonoran desert" in Mexico and the United States. Ann Missouri Botan Garden 59(2):218-223

- Solbrig OT & KS Bawa. 1975. Isoenzyme variation in species of *Prosopis* (Leguminosae). *Journal Arnold Arboretum* 56: 398 - 412.
- Solbrig OT & PD Cantino. 1975. Reproductive adaptations in *Prosopis* (Leguminosae, Mimosoideae). *Journal Arnold Arboretum* 56: 185 - 210.
- Soltis DE & PS Soltis. 1998. Choosing an approach and an appropriate gene for phylogenetic analysis. En: Soltis DE, Soltis PS y Doyle JJ (eds). 1998. *Molecular Systematics of Plants II. DNA sequencing*. pp: 1-42. Chapman & Hall, New York.
- Soltis DE, PS Soltis & JJ Doyle. 1998. *Molecular Systematics of Plants II. DNA sequencing*. Kluwer Academic Publishers. Norwell, Massachusetts, USA.
- Southern EM. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98:503-517.
- Stanford AM, R Harden & CR Parks. 2000. Phylogeny and biogeography of Juglans (Juglandaceae) based on matK and ITS sequence data. *American Journal of Botany* 87(6): 872-882.
- StatSoft, Inc. 1995. STATISTICA for Windows [Computer program manual]. Tulsa, OK: StatSoft, Inc., 2300 East 14th Street, Tulsa, OK, 74104-4442, (918) 749-1119, fax: (918) 749-2217, e-mail: info@statsoftinc.com, WEB: <http://www.statsoftinc.com>.
- Sugiura M. 1992. The chloroplast genome. *Plant Molecular Biology* 19:149-168.
- Surles SE, JL Hamrich & BC Bongarten. 1990. Mating systems in open pollinated families of black locust (*Robinia pseudoacacia*). *Silvae Genetica* 39: 35 - 40.
- Swofford DL. 1998. PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (* and other Methods) Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Swofford DL & RB Selander. 1981. BIOSYS-1.7: a FORTRAN program for the comprehensive analysis of electrophoretic data in populations genetics and systematics. *J. Hered.* 72: 281-283.
- Swofford DL & GJ Olsen. 1990. Phylogeny reconstruction. En: *Molecular Systematics*. Hillis DM y C. Moritz (eds). pp 411-501. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Taberlet P, L Gielly, G Pautou & J Bouvet. 1991 Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology* 17:1105-1109
- Tateno Y, N Takesaki & M Nei. 1994. Relative efficiencies of the maximum likelihood, neighbor-joining, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 11:261-277.
- Templeton AR. 1983. Phylogenetic inference from restriction endonuclease cleavage site maps with particular reference to the evolution of humans and the apes. *Evolution* 37:221-244.
- Templeton AR. 1989. The meaning of species and speciation: A genetic perspective. En: Otte D & JA Endler (eds.) *Speciation and its consequences*. pp. 3-27. Sinauer Associates Inc., Sunderland, Massachusetts.
- Templeton AR. 1992. Human origins and analysis of mitochondrial DNA sequences. *Science* 255:737.
- Thompson JD, DG Higgins & TJ Gibson. 1994. Clustal W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignments through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acid Research* 22:4673-4680.
- Thomson WF & RB Flavell. 1988 DNase I sensitivity of ribosomal RNA genes in chromatin and nucleolar dominance in wheat. *Journal of Molecular Biology* 204:535-548. Citado en Soltis DE y PS Soltis. 1998. Choosing an approach and an appropriate gene for phylogenetic analysis pp: 1-42. En: 1998. *Molecular Systematics of Plants II. DNA sequencing*. Soltis DE, Soltis PS y Doyle JJ (eds). Chapman & Hall, New York.

- Tortorelli L. 1956. *Maderas y Bosques argentinos* Editorial ACME. Bs As. 910 pp.
- Turner ME, JC Stephens & WW Anderson. 1982. Homozigosity and patch structure in plant populations as a result of nearest-neighbor pollination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 79:203-207.
- Verga AR. 1995. Genetische Untersuchungen an *Prosopis chilensis* und *Prosopis flexuosa* (Mimosaceae) im trockenen Chaco Argentinien. PhD Diss. En: Göttingen Research Notes in Forest Genetics. Göttinger Fortgenetische Berichte. Abteilung für Forstgenetik und Forstpflanzenzüchtung der Universität Göttingen. ISSN 0940-7103.
- Vilardi JC, BO Saidman & RA Palacios. 1988. Muestreo según variabilidad. En *Prosopis en Argentina*. Documento preliminar elaborado para el I taller Internacional sobre Recursos genéticos y Conservación de Germoplasma en *Prosopis*. pp:119-124. FCA. UNC-FAO, PIRB.
- Villagra PE. 1995. Temperature effects on germination of *Prosopis argentina* and *P. alpataco* (Fabaceae, Mimosoidae). *Seed Sci & Technol*. 23: 639-646.
- Villagra PE. 1997. Germination of *Prosopis argentina* and *P. alpataco* seeds under saline conditions. *Journal of Arid Environments* 37:261-267.
- Villagra PE & FA Roig Juñet. 1997. Wood structure of *Prosopis alpataco* and *P. argentina* growing under different edaphic conditions. *IAWA Journal* 18(1):37-51.
- Watson LE, H Sayed-Ahmed & A Badr. 2000. Molecular phylogeny of the Old World *Trifolium* (Fabaceae), based on plastid and nuclear markers. *Plant Syst. Evol.* 224: 153-171.
- Weir BS & CCC Cockerham. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38:1358-1370.
- Wells PW & JH Hunziker. 1977. Origin of the creosote bush (*Larrea*) deserts of southwestern North America. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 63:843-861.
- Wen J. 2000. Internal transcribed spacer phylogeny of the Asian and Eastern North american disjunct *Aralia* (sect) *Dimorphanthus* (Araliaceae) and its biogeographic implications. *Int. J. Plant Sci.* 16(6):959-966.
- Wendel JF & JJ Doyle. 1998. Phylogenetic incongruence: window into genome history and molecular evolution. En: *Molecular Systematics of Plants II. DNA sequencing*. Soltis DE, Soltis PS y Doyle JJ (eds). pp: 265-296. Chapman & Hall, New York.
- Whitlock MC & DE McCauley. 1999. Indirect measures of gene flow and migration: $F_{st} \approx 1/(4Nm + 1)$. *Heredity* 82: 117-125.
- Wilcoxon F, SK Katti & RA Wilcox. 1970. Critical values and probability levels for the Wilcoxon rank sum test and the Wilcoxon signed rank test. En: *Selected tables in Mathematical Statistics*, Vol 1. HL Harter y DB Owen (eds). pp: 171-259. Markham Publishing, Chicago.
- Williams J, A Kubelik & K Livack. 1990. DNA Polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acid Research*. 18: 6531-6535.
- Woese CR, O. Kandler & ML Wheelis. 1990. Toward a natural system organisms: Proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:4576-4579.
- Wolfe KH, Li WH & PM Sharp. 1987. Rates of nucleotide substitution vary greatly among plant mitochondrial, chloroplast and nuclear DNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:9054-9058.
- Wright S. 1931. Evolution in Mendelian populations. *Genetics* 16:97-159.
- Wright S. 1946. Isolation by distance under diverse systems of mating. *Genetics* 31:39-59.
- Wright S. 1951. The genetical structure of populations. *Annals Eugenics* 15:323-354.

- Wright S: 1978. Evolution and the genetics of Populations, Vol 4. En: Variability within and among natural populations. University of Chicago Press, Chicago.
- Yang YW, KN Lai, PY Tai, DP Ma & WH Li 1999. Molecular phylogenetic studies of Brassica, Rorippa, Arabidopsis and allied genera based on the internal transcribed spacer region of 18S-25S rDNA. Molecular Phylogenetics and Evolution 13(3)455-462.
- Young AG & AHD Brown. 1998. Comparative analysis of the mating system of the rare woodland shrub *Daviesia suaveolens* and its common congener *D. mimosoides*. Heredity 80: 374-381.
- Zimmer EA, SL Martin, SM Beverley, YW Kan & AC Wilson. 1980. Rapid duplication and loss of genes coding for the chains of hemoglobin. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 77:2158-2162.