



Universidad de Buenos Aires  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

# Biblioteca Digital FCEN-UBA

## Estudio de la variación alozímica en el género prosopis

Saidman, Beatriz Ofelia

1985

Tesis Doctoral

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales  
Universidad de Buenos Aires

[www.digital.bl.fcen.uba.ar](http://www.digital.bl.fcen.uba.ar)

Contacto: [digital@bl.fcen.uba.ar](mailto:digital@bl.fcen.uba.ar)

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir. 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. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Fuente / source:

Biblioteca Digital de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales - Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESTUDIO DE LA VARIACION ALOZIMICA EN EL GENERO PROSOPIS

POR BEATRIZ OFELIA SAIDMAN

DIRECTOR: PROF. DR. JUAN H. HUNZIKER

LUGAR DE TRABAJO: LABORATORIO DE GENETICA,  
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL TITULO DE DOCTOR EN CIENCIAS  
BIOLÓGICAS

-1985-

*Reg. N.º 1893*

*- 1893 -*  
*g. 2*

A mi esposo,

A mis padres.

## AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi gratitud y reconocimiento al Director de esta tesis, Prof. Dr. Juan H. Hunziker, quien me brindó la posibilidad de realizar este estudio con su apoyo moral, continua orientación, valiosas discusiones, sugerencias y lectura crítica del manuscrito. También debo agradecerle el haberme dado la oportunidad de realizar viajes al exterior que me permitieron perfeccionarme en la técnica de electroforesis de isoenzimas para poder luego aplicarla en nuestro medio.

Agradezco profundamente, al Prof. Carlos A. Naranjo quien me guió en mis primeros pasos en el aprendizaje de las técnicas electroforéticas. Tanto él como la Dra. Lidia Poggio, me alentaron y me dieron valiosas sugerencias durante el desarrollo de este trabajo.

Deseo también expresar mi reconocimiento al Ing. Ramón A. Palacios, quien generosamente me cedió parte de los materiales utilizados, realizó la identificación taxonómica y aportó además interesantes datos biogeográficos.

Agradezco, asimismo, a la Dra. Helga Winge (Dpto. de Genética, Universidad de Porto Alegre, Brasil) y al Prof. Daniel Zohary (Dpto. de Genética, Universidad de Jerusalén, Israel), por haberme dado la posibilidad de perfeccionarme en la técnica de electroforesis de Isoenzimas en los laboratorios por ellos dirigidos.

A mi esposo, Dr. Juan C. Vilardi, debo todo mi agradecimiento, por que con su bondad, paciencia, conocimientos, sugerencias permanentes y lectura crítica de la tesis, me ayudó durante el desarrollo de este trabajo.

Quisiera también dar las gracias a aquellos compañeros de trabajo que me brindaron su apoyo durante los años de realización de esta tesis.

Este trabajo pudo llevarse a cabo gracias al apoyo del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Subsecretaría/ de Ciencia y Técnica y de la ONU (PNUD-UNESCO), a través de los subsidios/ otorgados a los Profesores Hunziker, Naranjo y Poggio. Por este motivo qui siera expresar mi gratitud a las mencionadas instituciones.

Este estudio fue realizado mientras ejercí cargos docentes en el / Dpto. de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales // (Universidad de Buenos Aires), institución a la que agradezco profundamente el invaluable apoyo recibido a través de varios años.

TABLA DE CONTENIDO

	Páginas
INTRODUCCION .....	3
Electroforesis de isoenzimas.....	7
Ventajas y desventajas de la utilización de las isoenzimas pa- ra estudios poblacionales, taxonómicos y evolutivos.....	8
Género <u>Prosopis</u> .....	13
OBJETIVO DEL TRABAJO.....	19
MATERIALES Y METODOS.....	21
Colección y conservación del material.....	32
Obtención de las semillas y método de germinación.....	33
Elección de los sistemas isoenzimáticos.....	33
Electroforesis.....	34
I) Preparación de los geles de poliacrilamida.....	35
A) Peroxidasa, Esterasa y Superóxido Dismutasa.....	35
B) Aminopeptidasa.....	36
C) Glutamato Oxalacetato Transaminasa.....	36
II) Preparación de los geles de almidón.....	37
A) Alcohol Dehidrogenasa.....	38
B) 6-Fosfogluconato Dehidrogenasa.....	38
Preparación de la muestra.....	39
Siembra del material en los geles.....	40
Corrida electroforética.....	41
Tampones utilizados en las cubas electroforéticas.....	41
A) Esterasa, Peroxidasa y Superóxido Dismutasa.....	41
B) Aminopeptidasa.....	41
C) Glutamato Oxalacetato Transaminasa.....	41
D) Alcohol Dehidrogenasa.....	42
E) 6-Fosfogluconato Dehidrogenasa.....	42
Revelado y fijación de los geles.....	42
A) Esterasa.....	42
B) Peroxidasa.....	43
C) Superóxido Dismutasa.....	43
D) Aminopeptidasa.....	44
E) Glutamato Oxalacetato Transaminasa.....	45
F) Alcohol Dehidrogenasa.....	46

G) 6-Fosfogluconato Dehidrogenasa.....	47
Métodos utilizados para la determinación de los posibles <u>loci</u> y sus alelos.....	47
Cuantificación de la variabilidad genética y estimación de la similitud entre especies.....	48
Número de clasificación y designación de las enzimas.....	51
RESULTADOS.....	52
Alcohol Dehidrogenasa. E.C. 1.1.1.1. (ADH).....	52
Selección de los órganos analizados.....	52
Sección Algarobia.....	52
I) <u>P. ruscifolia</u> y <u>P. nigra</u> .....	52
II) <u>P. hassleri</u> y <u>P. alba</u> .....	53
III) <u>P. caldenia</u> , <u>P. alpataco</u> y <u>P. flexuosa</u> .....	53
IV) <u>P. vinalillo</u> .....	54
V) Híbridos interespecíficos.....	54
a) <u>P. hassleri</u> x <u>P. ruscifolia</u> .....	54
b) <u>P. hassleri</u> x <u>P. alba</u> .....	58
c) <u>P. flexuosa</u> x <u>P. alba</u> .....	58
d) <u>P. flexuosa</u> x <u>P. alpataco</u> .....	58
Sección Strombocarpa.....	58
Determinación de los probables <u>loci</u> y alelos.....	59
Sección Algarobia.....	59
Sección Strombocarpa.....	64
Glutamato Oxalacetato Transaminasa. E.C. 2.6.1.1. (GOT).....	68
Selección de los órganos analizados.....	68
Sección Algarobia.....	68
I) <u>P. ruscifolia</u> , <u>P. alba</u> , <u>P. hassleri</u> , <u>P. nigra</u> , <u>P. flexuosa</u> , <u>P. alpataco</u> , <u>P. caldenia</u> y <u>P. vinalillo</u> .....	68
II) <u>P. ruscifolia</u> x <u>¿P. alba?</u> , <u>P. ruscifolia</u> x <u>P. hassleri</u> , <u>P. alba</u> x <u>P. hassleri</u> y <u>P. alpataco</u> x <u>P. flexuosa</u> .....	71
III) <u>P. alba</u> x <u>P. flexuosa</u> y <u>P. nigra</u> x <u>P. hassleri</u> .....	71
IV) <u>P. caldenia</u> , <u>P. flexuosa</u> y <u>P. alpataco</u> , provenientes de un <u>enjambre híbrido</u> .....	71
Determinación de los probables <u>loci</u> y alelos.....	72
Sección Strombocarpa.....	87
Determinación de los posibles <u>loci</u> y alelos.....	87

	Páginas
Esterasa. E.C. 3.1.1. (EST).....	93
Selección de los órganos analizados.....	93
Sección Algarobia.....	93
Semillas 24 hs. después de iniciada la germinación.....	93
Plántulas con 7 y 13 días de germinación.....	94
Reacción de las esterases frente a los diferentes sustra- tos.....	94
Determinación de los probables <u>loci</u> y alelos.....	101
Sección Strombocarpa.....	117
Reacción de las diferentes isoenzimas frente a los diferen- tes sustratos: Probables <u>loci</u> y alelos.....	117
Peroxidasa. E.C. 1.11.1.7. (PRX).....	122
Selección de los órganos analizados.....	122
Sección Algarobia.....	122
Determinación de los probables <u>loci</u> y alelos.....	124
Sección Strombocarpa.....	126
Determinación de los probables <u>loci</u> y alelos.....	126
6-Fosfogluconato Dehidrogenasa. E.C. 1.1.1.43. (6-PGD).....	135
Selección de los órganos analizados.....	135
Sección Algarobia.....	135
Determinación de los probables <u>loci</u> y alelos.....	138
Sección Strombocarpa.....	139
Aminopeptidasa E.C. 3.4.1.2. (AMP).....	140
Selección de los órganos analizados.....	140
Sección Algarobia.....	140
Determinación de los posibles <u>loci</u> y alelos.....	142
Sección Strombocarpa.....	147
Determinación de los probables <u>loci</u> y alelos.....	154
Superóxido Dismutasa.E.C. 1.15.1.1. (SOD).....	158
Selección de los órganos utilizados.....	158
Sección Algarobia y Strombocarpa.....	158
Determinación de los probables <u>loci</u> y alelos.....	160
Variabilidad Intrapoblacional e Identidad Genética entre Pobla- ciones.....	162
DISCUSION.....	171
<u>A</u> lcohol Dehidrogenasa.....	171

	Páginas
Glutamato Oxalacetato Transaminasa.....	174
Esterasa.....	175
Peroxidasa.....	179
Aminopeptidasa.....	182
Superóxido Dismutasa.....	184
6-Fosfogluconato Dehidrogenasa.....	186
Cuantificación de la variabilidad y diferencias interespecíficas.	189
A) <u>Locí</u> diagnósticos.....	189
B) Estimación de la variabilidad genética en las especies de <u>Prosopis</u> .....	191
B.1.1) Porcentaje de <u>loci</u> polimórficos: Sección Algarobia.....	191
B.1.2) Porcentaje de <u>loci</u> polimórficos: Sección Strombocarpa..	192
B.2) Frecuencia media esperada de heterocigotas por <u>locus</u> ( $\bar{H}$ ): Sección Algarobia y Strombocarpa.....	193
B.3) Variabilidad genética en <u>P. ruscifolia</u> .....	194
Índices de similitud y distancia genética.....	195
RESUMEN.....	205
REFERENCIAS.....	208



## INTRODUCCION

El concepto más ampliamente aceptado actualmente de la evolución, propone que ésta consistiría en la modificación del acervo genético de las poblaciones (Dobzhansky, 1951).

En sus comienzos, la revolucionaria idea de la "evolución por selección natural" (Darwin, 1859) no pudo ser totalmente comprendida debido a que la genética aún no se había desarrollado. Mendel (1866) estableció las bases de la herencia, pero debieron pasar muchos años para que éstas fueran reconocidas. Posteriormente Morgan (1911), estudiando la mosca de la fruta (Drosophila), pudo establecer el concepto de gen y demostrar por pruebas genéticas de entrecruzamiento y recombinación que los genes se disponían linealmente en los cromosomas. Por esa misma época Hardy (1908) y Weinberg (1908) establecieron las bases de la genética de poblaciones.

Así, debieron pasar más de cincuenta años para que la Genética pudiera aportar las bases lógicas y la evidencia experimental para la teoría de Darwin de la evolución por selección natural, que según Suzuki et al. / (1981) podría resumirse en líneas generales en tres principios: 1) El principio de la variación: entre individuos de una población existe variación en morfología, fisiología y comportamiento, 2) El principio de la herencia: la descendencia es más parecida a sus progenitores que a individuos no emparentados y 3) El principio de la selección: Algunas formas son más exitosas que otras en cuanto a supervivencia y reproducción en un dado ambiente.

Una de las mayores dificultades para el estudio del proceso evolutivo es la valoración de la variación genética oculta en las poblaciones naturales. El desarrollo de métodos para analizar dicha variación a nivel/

de loci precisos debió esperar el avance de la biología molecular.

Beadle y Tatum (1941), trabajando con Neurospora propusieron la hipótesis de que un gen codificaba una enzima. Posteriormente la misma fue / modificada estableciéndose que un cistrón codifica un polipéptido (Benzer, 1955, 1961). Con la introducción de éstos y otros conceptos nuevos, se comprendió que la evolución biológica consistiría en cambios de la información genética de las poblaciones, la cual es llevada en la mayoría de los organismos por el ácido desoxirribonucleico (DNA) (Avery et al., 1944).

En 1958, Crick enunció la hipótesis de que el DNA determina la secuencia de aminoácidos de un polipéptido y que dicha secuencia establece / la estructura tridimensional de la proteína. De esto se desprenden dos importantes consecuencias: 1) Una secuencia lineal de nucleótidos (DNA) determinarí una secuencia de aminoácidos específica. Esta relación está especificada en el código genético (Crick et al., 1961; Nirenberg y Matthei, 1961). 2) Dado que las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos serían / colineales, un cambio mutacional en una posición determinada de la secuencia de nucleótidos daría lugar a un cambio en la correspondiente posición de la secuencia de aminoácidos.

Los experimentos de Yanofsky et al. (1967) realizados con la cadena polipeptídica A de la enzima triptofano sintetasa de E. coli fueron una prueba contundente de la existencia de esta colinealidad. Este trabajo junto a otros, principalmente los de Benzer (1955, 1959, 1961) que trabajó // con el fago  $T_4$  y una cepa K lisogénica de E. coli, permitieron comprender / la naturaleza del gen. Este sería una sección de DNA que contiene la información para la síntesis de una proteína. La unidad funcional que contiene / la información para la síntesis de un polipéptido, correspondería al cistrón (Benzer, 1959, 1961).

Determinada la naturaleza del gen y establecida la colinealidad en

tre las bases nucleotídicas del DNA y los aminoácidos de los polipéptidos, se idearon métodos de análisis indirectos que permiten analizar la varia-ción genética en las poblaciones, y estimar las divergencias evolutivas entre diferentes organismos a partir de las homologías entre sus genes.

Evidentemente, dos individuos presentarán mayor homología entre // sus genes cuanto más estrechamente relacionados se encuentren. Si bien es muy difícil poder estimar en forma directa la variación de los genes dentro de las poblaciones y las homologías entre los genes de distintos organismos, usando el concepto de colinealidad entre las bases nucleotídicas y los aminoácidos de los polipéptidos, se pueden estudiar las secuencias de estos últimos en distintos individuos de una misma especie para ver si varían, estimando de esta forma las diferencias nucleotídicas existentes entre los mismos. Este tipo de análisis, así como la hibridación in vitro / (Hall y Spiegelman, 1961) e in situ (Pardue y Gall, 1970) de ácidos nucleicos extraídos de distintos individuos y la electroforesis de isoenzimas (Hunter y Markert, 1957), han permitido realizar importantes estudios/ en el campo de la genética de poblaciones, la evolución y la taxonomía, ya que pueden utilizarse como criterio de valoración de las homologías a nivel molecular.

El presente estudio se basó en una de estas técnicas, la electroforesis de isoenzimas, cuyas características y alcances más importantes se / discutirán ampliamente más adelante.

Con el surgimiento de las técnicas mencionadas se puso de manifiesto la gran diversidad genética de las poblaciones, quedando así invalidado el modelo clásico de Müller (1950) y Morton et al. (1956), quienes consideraban que todos los individuos de una misma especie o raza serían homocigotas para la mayoría de sus loci génicos y que una minoría de los loci serían heterocigotas para alelos deletéreos que habrían surgido por mutación,

y que la selección normalizadora tendería a eliminar o bien a mantener en frecuencias lo más bajas posible.

En contraposición con el modelo clásico de la estructura poblacional, se formuló entonces el modelo equilibrado (Wallace, 1958; ver Lewontin, 1974, pág. 25) que propondría que los individuos de una especie de reproducción sexual y fecundación cruzada serían heterocigotas para una proporción considerable de loci génicos. Parte de dicha variabilidad sería generada por mutación, que produce generalmente mutantes deletéreos a los // que se contraponen la selección natural. Sin embargo este modelo implica además que la mayor parte de la variabilidad genética sería mantenida por // diversas formas de selección equilibradora. Esta hipótesis, sin embargo, // presentaba dificultades muy serias para explicar el hecho de que, si los // polimorfismos se mantienen por fuerzas selectivas muy fuertes, una gran // proporción de los individuos de las poblaciones estaría mal adaptada y constituiría una lastre genético muy difícil de tolerar.

Para salvar este problema, varios autores (King y Jukes, 1969; Kimura, 1979, 1983; Kimura y Ohta, 1971; Nei, 1975; etc.) propusieron que // los cambios mutacionales a nivel molecular y una gran mayoría de los polimorfismos encontrados en las poblaciones naturales serían neutros desde el punto de vista adaptativo. Su destino en las poblaciones estaría determinado por el azar y, por lo tanto, las poblaciones podrían acumular sin restricción alguna, cantidades muy importantes de variabilidad genética.

A partir de entonces, las teorías que consideran a la selección como el único proceso que rige la evolución (Clásica y Equilibrada) suelen // ser denominadas panseleccionistas y la teoría que supone la neutralidad de la mayoría de las variantes genéticas, panneutralista.

En la actualidad, la discusión entre los sostenedores de las teorías

seleccionista y neutralista continúa Kimura (1983) propone una nueva versión de la teoría neutralista en la que defiende la idea de que la selección a nivel molecular actúa eliminando las variantes nuevas que surgen / por mutación y que perjudican la funcionalidad de la molécula, pero, afectando las regiones de la proteínas menos sujetas a restricciones funcionales, se podrían fijar mutaciones neutras por deriva genética. Los polimorfismos proteicos, de acuerdo a esta hipótesis serían una fase de transición de la evolución molecular, pero habiendo modificaciones ambientales, / parte de los alelos antes neutros, podrían ser seleccionados.

#### ELECTROFORESIS DE ISOENZIMAS

Para poder estimar las divergencias evolutivas entre diferentes organismos se debería estudiar las homologías de sus genes, ya que es de suponer que dos individuos estarán más estrechamente relacionados cuanto mayor homología exista entre sus loci. Debido a la imposibilidad de realizar este tipo de estudios se han ideado otros métodos de análisis que, en forma indirecta, permiten estudiar las divergencias entre poblaciones y especies. Dado que la expresión primaria de un gen es la formación de un polipéptido (Beadle y Tatum, 1941; Benzer, 1955, 1961), el estudio de las enzimas daría una primera aproximación al estudio del gen.

Existen diferentes y variadas técnicas que posibilitan el análisis de las proteínas, sean éstas enzimáticas o no. Una de las técnicas de más / rápida y fácil aplicación, que permite poner en evidencia variaciones proteicas individuales, es la electroforesis en un medio que actúa como soporte y filtro como ser geles de almidón, poli(acrilamida), etc.

En términos generales la electroforesis es la migración diferencial de las proteínas en un campo eléctrico, donde la velocidad de despla-

zamiento de las partículas depende de la carga eléctrica neta, y de su tamaño y forma.

Un precursor de esta técnica ha sido Tiselius (1937), al cual le sucedieron muchos otros investigadores que mejoraron el método, desarrollando la electroforesis de zona en gel de almidón (Smithies, 1955; Smithies y Poulik, 1956; Poulik 1957) y en poliacrilamida (Raymond y Weintraub 1959), utilizando posteriormente métodos de reacción histoquímicos para localizar las zonas de actividad enzimática directamente en el medio de soporte (para una revisión más amplia ver Brewer y Sing, 1970).

La combinación de la electroforesis y de la tinción específica hace posible distinguir una enzima particular entre cientos que pueden estar presentes en un extracto crudo. Así se han podido detectar diferentes formas moleculares de una enzima, derivadas de un mismo organismo y que catalizan la misma reacción. A ellas se las ha denominado ISOENZIMAS, Markert y Müller (1959) y se dió el nombre de ALOZIMAS a aquellas variantes isoenzimáticas especificadas por alelos del mismo locus (Prakash et al., 1969). Las diferentes bandas que aparecen en el gel luego de la tinción por métodos histoquímicos recibieron el nombre de zimograma (Hunter y Markert, // 1957).

#### Ventajas y desventajas de la utilización de las isoenzimas para estudios poblacionales, taxonómicos y evolutivos.

Hubby y Lewontin (1966) y Lewontin y Hubby (1966) propusieron que el estudio de las moviidades electroforéticas de las enzimas y proteínas permitiera profundizar en ciertos problemas evolutivos que, con las técnicas convencionales de análisis genéticos, resultaban muy difíciles. Entre ellos se pueden citar: a) reconocimiento y estimaciones directas de homoci

gotas para diferentes alelos, así como los heterocigotas, sin recurrir a / experimentos genéticos; b) detección de diferencias fenotípicas causadas / por sustitución alélica de un único locus; c) distinción entre las sustituciones alélicas de un locus y la sustitución en otro locus; d) estimación / del polimorfismo y la variabilidad genética en poblaciones naturales. Con estas informaciones se pueden realizar estudios evolutivos y sistemáticos / en diferentes taxones basados en el análisis de diferencias génicas indivi / duales.

Otra ventaja importante de esta técnica es que al detectar cambios / mutacionales que son acompañados por cambios en el estado de carga de la / proteína, permite establecer una correlación entre la distancia mutacional (o evolutiva) entre dos alelos y la diferencia entre las velocidades de mi / gración en el gel de las proteínas que ellos codifican (Marshall y Brown, / 1975).

Esta técnica además puede ser utilizada para determinar si ha ocu / rrido variación en las frecuencias alélicas a lo largo del tiempo de exis / tencia de una especie en particular (Berger, 1971; Dobzhansky y Ayala, 1973; etc.), como también a lo largo de un gradiente geográfico y/o ambiental // (Allard et al., 1972; Clegg y Allard, 1972; Hamrick y Allard, 1972; Koehn y / Rasmussen, 1967; Koehn y Mitton, 1972; Koehn et al., 1980, a, b y c; Rick / y Tamksley, 1981; etc.). Asimismo permite realizar discriminaciones taxonó / micas entre diferentes especies (Selander et al., 1971; Bosbach y Munster, / 1981; etc.) y entre especies gemelas (Ayala et al., 1974 a, b.; etc.). Se / utiliza esta técnica en análisis de variabilidad genética (Burdon et al., / 1980; Tabachnick et al., 1982; Vello Jaaska, 1981; Zera, 1981; etc.) y tam / bién en estudios ontogenéticos y de regulación génica (Chao y Scandalios, 1972; Hadacova, 1974; Meyerhof y Haley, 1975; Quail y Scandalios, 1971; // Scandalios, 1964, 1965, 1969, 1974, 1979; Scandalios y Espiritu, 1969; //

Scandalios et al., 1972; Scandalios y Baum, 1982; Torres y Hart, 1976; etc.).

A pesar de las grandes ventajas que parece presentar este método, / existen fuentes de error inherentes a la técnica que deben ser tomados en / cuenta en el análisis de los distintos problemas: a) La carga de una protef / na es sólo alterada cuando uno de sus aminoácidos es sustituido por otro / de carga diferente. Como ya se sabe, 16 aminoácidos son neutros y solamen- / te cuatro están cargados, dos positivamente: arginina y lisina, y dos nega- / tivamente: ácido aspártico y ácido glutámico. Conociendo estos datos Shaw / (1965) y Marshall y Brown (1975) estimaron que sólo 25 a 27 % de los casos / de sustituciones elélicas de aminoácidos serán detectados electroforética- / mente. b) Por otra parte, el hecho que dos enzimas tengan la misma movilli- / dad electroforética no necesariamente implica que sean idénticas. En efec- / to, estudios que han permitido determinar las secuencias de aminoácidos de / las protefnas (Boyer et al., 1972), análisis mediante desnaturalización // por calor de las mismas (Bernstein et al., 1973; Singh et al., 1976) y // electroforesis en gel de poro variable (Johnson, 1976) sugieren que una sim- / ple banda en un gel puede estar formada por más de una enzima. Por lo tan- / to, pruebas bioquímicas adicionales son necesarias para determinar si alo- / zimas con la misma movilidad, tienen diferente o igual secuencia de amino- / ácidos. Así, la electroforesis en general, provee una subestimación de la / cantidad de diferencias genéticas.

También es importante recordar que las evidencias electroforéti- / cas no dan ninguna información acerca del número de diferencias de aminoá- / cidos o etapas mutacionales que causan las diferencias en la movilidad de / las isoenzimas. Una diferencia en la movilidad puede reflejar una simple / sustitución nucleotídica o numerosos cambios en la secuencia nucleotídica. / Así la electroforesis puede demostrar que dos taxones tienen distintas iso- / enzimas, pero no provee información acerca de la cantidad de diferencias.

Por otra parte, dado que las enzimas participan intensamente en el metabolismo de los individuos y varían de acuerdo a sus necesidades, al // realizar estudios ~~isoenzimáticos~~, dirigidos a resolver problemas evolutivos y sistemáticos es muy importante tomar ciertas precauciones para evitar distorsiones en los resultados obtenidos. Durante el análisis es necesario en tonces, tomar en cuenta ciertos factores como ser: a) la edad del individuo, b) tejidos y órganos analizados y c) el ambiente en el cual el organismo / se desarrolla, ya que se ha visto que todos estos factores alteran los pa- / trones isoenzimáticos (Scandalios, 1969, 1974, 1979; McCown et al., 1969; / etc.).

También es necesario considerar el tamaño de la muestra a estudiar. Dado que existe un gran polimorfismo en poblaciones, tanto de animales como de plantas (Selander et al., 1971; Gottlieb, 1977; Hamrick, 1979) un análisis de las isoenzimas para el estudio de variaciones interespecíficas requeriría/ de una muestra que abarque tanto cuanto sea posible la variabilidad exis- / tente dentro de cada especie, a fin de no obtener una super o subestima- / ción de las diferencias interespecíficas. Sin embargo, se ha visto que en/ general las poblaciones coespecíficas son extremadamente similares genéti- / camente (Clegg y Allard, 1972; Gottlieb, 1973 a, 1974a; Babbel y Selander, / 1974; Rick y Fobber, 1975; Levy y Levin, 1975; etc.). Esto sugiere que las evidencias electroforéticas de una o unas pocas poblaciones muy frecuente- / mente constituyen una muestra adecuada de las especies a comparar (Gottlieb, 1977). Como se puede apreciar, existen discrepancias con respecto al núme ro de poblaciones que hay que utilizar para obtener una muestra que sea re- / presentativa de la especie. En última instancia ésto dependerá de cada ca- / so particular, según la variabilidad intraespecífica y el politipismo que se observe.

Para no obtener una súper o subestimación de la variabilidad genéti

ca en las poblaciones, hay que tener precaución en la elección de los sistemas isoenzimáticos. Gillespie y Kojima (1968), tomando como base el trabajo realizado con Drosophila, sugirieron que el grado de polimorfismo en las enzimas varía según la función, siendo generalmente menor en las enzimas que metabolizan la glucosa (Grupo I) que en las enzimas no específicas (Grupo II). Posteriormente Johnson (1974, 1979), estudiando en Drosophila la variación enzimática en términos de la utilización de los sustratos internos frente a los externos, encontró un mayor número de alelos en los loci que codifican las enzimas del grupo II.

Gillespie y Langley (1974), así como Johnson (1974), definieron // las enzimas del grupo I como "caracterizadas por un sustrato fisiológico / singular que generalmente es generado y utilizado intracelularmente", y // las enzimas del grupo II como aquellas "con sustratos fisiológicos múlti- / ples que reflejan la diversidad ambiental". Estos autores sólo se limita- / ron a estudiar las proteínas enzimáticas y clasificaron dentro del grupo I a las proteínas estructurales, ribosómicas y reguladoras, junto con la ma- / yor parte de las enzimas implicadas en la biosíntesis, el metabolismo in- / termedio, la glucólisis y el ciclo de ácido cítrico. Estos autores creen / que la proporción real de genes en el genoma que codifican las enzimas del grupo II es pequeña y está desproporcionadamente representada en los estu- / dios de la variación proteica.

A partir de estos hechos, cuando se emprende un estudio de variabi- / lidad genética, es necesario utilizar diferentes sistemas isoenzimáticos / que cubran en gran medida el espectro metabólico.

Hace unos años la técnica electroforética fue usada ampliamente pa- / ra resolver problemas sistemáticos y evolutivos en animales (Randerson, // 1965; Johnson y Selander, 1971; Selander et al., 1971; Lewontin, 1974; etc.)

En la actualidad esos estudios se han extendido al reino vegetal y ha surgido una gran cantidad de interesantes publicaciones (Ver revisiones en: Gottlieb, 1977; Hamrick et al., 1979 y Hamrick, 1979).

A pesar de las limitaciones aquí presentadas, la electroforesis de enzimas asociadas a métodos histoquímicos constituye uno de los mejores / instrumentos para estudios sobre la variación intra e interespecífica, así como de las divergencias surgidas entre especies de un grupo a lo largo de la evolución.

#### GENERO PROSOPIS

El género Prosopis , pertenece a la familia Leguminosae, subfamilia Mimosoideae y comprende alrededor de 44 especies (Burkart, 1976). Su / distribución abarca el S.O. Asiático, África y, predominantemente, desde / el oeste de América del Norte hasta la Patagonia en América del Sur.

La mayoría de las especies del género son árboles o arbustos que // presentan fecundación cruzada obligada (Simpson, 1977; Simpson y Solbrig, / 1977) y protoginia (Burkart, 1976).

La polinización de las mismas se realizaría principalmente por medio de insectos y el polen no se desplazaría grandes distancias. Así, se / ha observado que árboles aislados unos cientos de metros (500-600 m.) pre- / sentan poca o ninguna fructificación (com. pers. R. A. Palacios).

Las vainas de Prosopis han demostrado ser uno de los alimentos más antiguos utilizados por el hombre prehistórico en el Nuevo Mundo ya que pre- / sentan una fuente de carbohidratos y de proteínas en los desiertos de / Norte y Sud América.

Con las vainas recogidas de Prosopis en Hawaii, Argentina, Perú y

Chile se puede mantener ganado, pues es posible almacenarlas para utilizarlas con posterioridad. Se ha visto que estas vainas presentan un valor alimenticio semejante al de la cebada o el maíz (Habit et al., 1981), poseyendo un alto contenido proteico (Felker y Bandurski, 1977).

Su madera se utiliza como leña o carbón, sus frutos para la alimentación humana y sus primeros brotes como sustancias medicamentosas, siendo mínimo el insumo energético necesario para su explotación (Felker y Bandurski, 1979).

P. nigra exuda una sustancia que podría usarse en reemplazo de la goma arábiga (Habit et al., 1981). Las raíces de los algarrobos son también utilizadas para obtener tinturas para teñir lana, algodón y seda (Habit et al., 1981).

Las distintas especies de Prosopis se encuentran en lugares muy / secos, donde difícilmente pueden sobrevivir otras plantas (250 mm. a 75 mm anuales de lluvia); pueden tolerar y aún crecer con rapidez en suelos arenosos o salinos. Soportan fácilmente largos períodos de sequía, produciendo igualmente gran cantidad de vainas. Ecológicamente las vainas son importantes para la propagación endozoica, ya que las semillas germinan libremente después de pasar por el tracto digestivo de los animales, que comen / ávidamente dichos frutos. Otro hecho importante es que el pasaje por el // tracto digestivo también beneficia la germinación de las semillas, ya que / mata las larvas de Bruchidae (Insecta, Coleóptera) que destruyen las semillas y que siempre están presentes en los frutos de Prosopis. Estas legumbres nutritivas con semillas que son resistentes a los jugos gástricos de / los animales hervíboros representan una gran adaptación para su sobrevi- / vencia y dispersión (Hauman, 1947 a, b; Morello, 1951; Humphrey, 1958). / Las especies de Prosopis han comenzado a ser usadas en muchas partes del / mundo en planes de agroforestación (Huxley, 1983), así como para recuperar

zonas áridas ( Campbell, 1929; Leakey y Last, 1980) pues permiten: controlar el viento; estabilizar dunas impidiendo sus progresos hacia áreas de agricultura; controlar la erosión por el agua; incrementar el suministro de agua, permitiendo una mejor percolación de la misma; etc. En nuestro país, hasta el momento, se han usado en la mayoría de los casos otras especies, muchas de ellas introducidas, para lograr los mismo fines. Sin embargo las especies de Prosopis tienen un gran potencial económico y ecológico y su mayor conocimiento tal vez permita que en poco tiempo sean recurso aprovechable.

La taxonomía del género Prosopis presenta un problema harto difícil. Desde el año 1875, Bentham y otros autores ( Burkart, 1937, 1940, // 1952, 1976; Johnston, 1962; etc.) han vertido opiniones controvertidas acerca de las subdivisiones realizadas en este complejo. Recién en el año 1976 Burkart publicó su monografía sobre éste género, realizando un estudio profundo de las diferencias morfológicas de las especies y proponiendo una // nueva clasificación para el mismo.

La principal causa de discrepancias en la clasificación basada en la morfología reside en que algunas especies diploides, pertenecientes a la Sección Algarobia, son simpátridas en la región fitogeográfica Chaqueña (Nordeste de Argentina y Paraguay) y es frecuente entre ellas la hibridación e introgresión, creándose así nuevos fenotipos que dificultan la determinación morfológica. Estos híbridos, en su mayoría fértiles, podrían ser una posible fuente de variación genética ya que permitirían producir // nuevos genotipos que podrían capacitar a las especies para ocupar diferentes hábitats. Además, se han descrito ecotipos morfológicos en P. ruscifolia (Morello et al., 1971; Morello y Adamoli, 1974; Palacios y Bravo, 1974) P. glandulosa, P. laevigata y P. juliflora (Peacock y McMillan, 1965). De estas especies, P. glandulosa y P. ruscifolia son colonizadores e invasoras en

terrenos modificados por el hombre, La última de ellas tiene una amplia dis-//  
tribución en nuestro país y causa estragos en la zona fitogeográfica chaqueña/  
(Rodríguez Rebollar, 1947; Morello, 1970; Gómez et al., 1973). Esto se debe a  
que sus hojas contienen sustancias que, de acuerdo con la concentración son ca-  
paces de inhibir o retardar la germinación de semillas de otras plantas tales/  
como lechuga, alfalfa, tomate y alpiste (Souto y Eilberg, 1972) y que sus es-  
pinas, de gran tamaño, producen daños al ganado.

Existen, dentro de esta Sección, especies muy controvertidas como  
P.vinalillo que se considera originada a partir de la hibridación entre P.alba  
var. panta y P.ruscifolia (Burkart, 1976). Su morfología es generalmente inter-  
media entre la de sus posibles progenitores, y los estudios meióticos no mos-/  
traron diferencias significativas en el número de bivalentes por célula y de /  
quiasmas por bivalente entre las especies parentales y el presunto híbrido ///  
(Hunziker et al., 1975), siendo la fertilidad de éste casi normal.

A pesar de existir una gran variación morfológica intra e interespecí-  
fica debida a la gran cantidad de formas intermedias, dentro de la Sección Al-  
garobia se encuentra una considerable uniformidad para otros caracteres. Por /  
ejemplo, el número cromosómico en las especies diploides es  $2n=28$  (Hunziker et  
al., 1975, 1977). Burghardt y Palacios (1981, 1984) y Burghardt (1982) encontra-/  
ron una gran similitud proteica al estudiar mediante electroforesis las semi-/  
llas de especies de Prosopis. Estos autores también compararon los resultados/  
de estudios basados en un gran muestreo de árboles, con otros basados en semi-  
llas de unos 5 a 10 árboles por especie, siendo los resultados obtenidos nota-  
blemente semejantes. Estudios cromatográficos (Palacios y Bravo, 1981; Naranjo  
et al., 1984), mostraron similitudes más altas que las esperadas para especies  
diferentes. Hechos semejantes se encontraron al estudiar los aceites de /  
semillas de especies de este género (Madriñan Polo et al. /

1976).

No se han encontrado por lo tanto marcadores químicos que no sean / compartidos por dos o más especies y que permitan reconocer inequívocamente a una entidad de otra.

En la Sección Strombocarpa, también existen problemas taxonómicos. / Las especies P.reptans y P.strombulifera pertenecientes a la misma difieren de las de la Secc. Algarobia por ser alopátridas (la primera se encuentra / en el centro y la segunda en el Oeste Argentino) y ser muy semejantes morfo / lógicamente. Entre estas especies existen algunos individuos híbridos en zo / nas de contacto. En base a observaciones morfológicas (Burkart, 1976) y cro / matográficas (Carman, 1973) se sugiere que tal vez estas entidades sean "va / riedades" de una misma especie.

El género es considerado bastante primitivo dentro de las Mimosoi / deae y se cree que se habría originado en África, donde persiste solamente / P.africana, que es una de las especies menos especializadas (Burkart, 1976).

De acuerdo con la teoría de la deriva continental, África y América / estaban unidas hasta el período Cretácico-comienzos del Terciario, época en / la cual estas especies podrían haberse originado a partir de un antecesor / común. Por otra parte, debido a la distribución actual de Prosopis, no se / puede excluir la posibilidad de una flora desértica primitiva común a ambas / Américas la cual posteriormente se dividió en dos centros: el Mejicano-Teja / no y el Argentino-Paraguayo-Chileno, donde se encuentra la mayoría de las / especies (Burkart, 1976). En la Argentina se encuentra un centro de polimor / fismo morfológico y existe un importante número de especies, unas 28 en to / tal, de las cuales 13 son endémicas.

A pesar de toda la información ya obtenida sobre las especies del // complejo Prosopis, su sistemática continúa siendo discutida, y existen es //

casos estudios que cuantifiquen el grado de divergencia evolutiva y varia bilidad genética de las mismas. En los últimos años, el surgimiento de nuevas técnicas moleculares ha abierto grandes posibilidades para el estudio/ de dichos aspectos. Una de estas técnicas, la electroforésis de isoenzimas, ha sido ya aplicada a algunas especies del género Prosopis (Solbrig y Bawa, 1975; Whitmore y Bragg, 1979; Saidman, 1981, 1983, 1984; Saidman y Naranjo, 1982) y está constituyendo un valioso instrumento de trabajo en la resolu- ción de problemas taxonómicos y evolutivos.

### OBJETIVOS DEL TRABAJO

Dadas las particulares cualidades que presentan las especies de Propis, sería de gran interés desarrollar un programa de cruzamientos controlados con el objeto de explotar eficientemente caracteres heredables beneficiosos. No obstante, esto constituye un proyecto a largo plazo. En la actualidad se podrían obtener resultados considerablemente positivos mediante una mayor examinación y uso de la variación ya existente en las poblaciones naturales de las distintas especies. Para poder analizar y caracterizar esta variación es necesario entender la biología de las especies de este género, siendo este tipo de estudio fundamental para la futura explotación.

Con el objeto de ampliar los conocimientos que hasta el momento se tienen sobre éste género y aportar información acerca de la variabilidad / genética y las cuestionadas relaciones filogenéticas de sus especies, se estudió la variación alozímica de siete sistemas isoenzimáticos: Alcohol Dehidrogenasa, Glutamato Oxalacetato Transaminasa, 6- Fosfogluconato Dehidrogenasa, Aminopeptidasa, Superóxido Dismutasa, Peroxidasa y Esterasa, en poblaciones de especies pertenecientes a dos Secciones:

Sección Algarobia, Serie Ruscifoliae: P.ruscifolia.

P.hassleri.

P.vinalillo.

Serie Chilensis: P.nigra.

P.alba.

P.caldenia.

P.flexuosa.

P.alpataco.

Sección Strombocarpa, Serie Strombocarpace: P.reptans.

P.strombulifera

En ellas se analizó: a) El número y frecuencia de alelos de cada locus. b) El grado de polimorfismo en las poblaciones c) Las diferencias y / similitudes existentes entre especies, cuantificadas mediante la estimación de las distancias e identidades genéticas. En base a estos resultados se // discutió el grado de diferenciación y la variabilidad genética de dichas entidades. Se estudiaron también presuntos híbridos interespecíficos o derivados híbridos de la Secc. Algarobia, con el objeto de: i) utilizar los marcadores aloenzimicos propios de cada especie en la identificación certera de / los mismos; ii) observar los diferentes fenotipos isoenzimáticos correspondientes a segregantes para determinar la hipótesis más probable del mecanismo genético involucrado en la producción de isoenzimas. Se comparó además / el grado de polimorfismo de cada sistema isoenzimático en Prosopis con aquellos hallados por otros autores en otros organismos, tratando de aportar datos que permitan ampliar el conocimiento que se tiene acerca de la relación entre el grado de polimorfismo que presentan las enzimas según la función / que cumplen las diferentes rutas metabólicas y la estrategia adaptativa de las especies.

## MATERIALES Y METODOS

En la Tabla I, se registran las especies estudiadas, el número de / colección, las iniciales del colector de la muestra, localidad, cantidad / de semillas estudiadas y sistemas enzimáticos analizados en las diferentes / muestras poblacionales. En la Fig. 1 se indican los sitios de colección de / los materiales.

El Ing. Agr. R.A. Palacios y la Dra. L. Bravo (1981), determinaron / por características morfológicas y cromatográficas el material de P.ruscifo / lia de Chaco y Formosa y Departamento de Copo (Santiago del Estero), P.alba / (Formosa), P.hassleri (Formosa) y P.vinalillo (Chaco y Formosa). Los ejem- / plares de P.nigra de Sgo. del Estero y P.ruscifolia del Dpto. de Avellaneda / (Sga. del Estero) fueron identificados morfológicamente por el Ing. R.A. Pa / lacios.

El Lic. C.A. Naranjo, la Dra. L. Poggio y la Lic. S. Enus Zeiger // (1984), realizaron la determinación sistemática, utilizando datos morfológi / cos y cromatográficos de los ejemplares de P.nigra de la población de En- / tre Ríos.

El material coleccionado en La Pampa (P.flexuosa, P.alpataco y P.cal / denia), fue determinado en el campo por los Ingenieros P.Steibel y H.Troi / ani, y posteriormente, la identificación de estos individuos fue confirmada / utilizando datos morfológicos y cromatográficos por el Lic. C.A.Naranjo y / la Lic. S.Enus Zeiger (1983).

Los ejemplares de P.strombulifera de Catamarca, P.strombulifera de / Rio Negro y P.reptans (Sgo. del Estero) fueron determinados por el Dr. Juan / H. Hunziker, la Lic. A. Burghardt y la Lic. S.E. Zeiger, respectivamente.

Los ejemplares de herbario han sido depositados en el herbario de /

Tabla 1: Procedencia de los ejemplares, número de semillas estudiadas y sistemas enzimáticos analizados en cada muestra.

ESPECIE	COLECTOR *	Nº COLECC. *	LOCALIDAD	Cant.de semillas *	Sistemas enzimáticos analizados * en cada muestra	
<i>P. ruscifolia</i> Grisebach			<u>Formosa:</u>			
			Depto. Patiño			
			(Estancia La Primavera)			
	R.A.P.	307		43	EST-GOT-ADH-AMP-PRX-6-PGD-SOD	
	R.A.P.	313		36	EST-GOT-ADH-AMP-PRX-6-PGD-SOD	
	R.A.P.	321		45	EST-GOT-ADH-AMP-PRX-6-PGD-SOD	
	R.A.P.	332		45	EST-GOT-ADH-AMP-PRX-6-PGD-SOD	
	R.A.P.	335		44	EST-GOT-ADH-AMP-PRX-6-PGD-SOD	
	R.A.P.	478		43	EST-GOT-ADH-AMP-PRX-6-PGD-SOD	
	R.A.P.	550		44	EST-GOT-ADH-AMP-PRX-6-PGD-SOD	
	R.A.P.	554		50	EST-GOT-ADH-AMP-PRX-6-PGD-SOD	
				<u>Chaco:</u>		
				Depto. Güemes.		
				Ruta Nacional N°95		
	R.A.P.	526			10	EST-ADH-6-PGD-SOD
	R.A.P.	527			10	EST-ADH-6-PGD-SOD
	R.A.P.	530			10	EST-ADH-6-PGD-SOD
	R.A.P.	531			10	EST-ADH-6-PGD-SOD
R.A.P.	533			10	EST-ADH-6-PGD-SOD	
R.A.P.	534			10	EST-ADH-6-PGD-SOD	
R.A.P.	536			10	EST-ADH-6-PGD-SOD	
R.A.P.	538			10	EST-ADH-6-PGD-SOD	
			<u>Santiago del Estero</u>			
			Depto. Copo, Monte			
			Quemado			
R.A.P.	571			50	EST-GOT-ADH-6-PGD-SOD	
R.A.P.	572			50	EST-GOT-ADH-6-PGD-SOD	
R.A.P.	573			50	EST-GOT-ADH-6-PGD-SOD	
R.A.P.	576			50	EST-GOT-ADH-6-PGD-SOD	
R.A.P.	577			50	EST-GOT-ADH-6-PGD-SOD	

(CONTINUA)

Tabla 1. CONTINUACION

ESPECIE	COLECTOR	N° COLECC.*	LOCALIDAD	Cant.de* semillas	Sistemas enzimáticos analizados* en cada muestra
<i>P. muscifolia</i>	B.O.S.	146	Dpto. Avellaneda Herrera	17	EST-GOT-ADH-AMP-PRX-6-PGD-SOD
	B.O.S.	147		17	EST-GOT-ADH-AMP-PRX-6-PGD-SOD
	B.O.S.	148		17	EST-GOT-ADH-AMP-PRX-6-PGD-SOD
	B.O.S.	149		17	EST-GOT-ADH-AMP-PRX-6-PGD-SOD
	B.O.S.	150		17	EST-GOT-ADH-AMP-PRX-6-PGD-SOD
	B.O.S.	151		17	EST-GOT-ADH-AMP-PRX-6-PGD-SOD
	B.O.S.	152		17	EST-GOT-ADH-AMP-PRX-6-PGD-SOD
	B.O.S.	153		17	EST-GOT-ADH-AMP-PRX-6-PGD-SOD
	B.O.S.	154		17	EST-GOT-ADH-AMP-PRX-6-PGD-SOD
	B.O.S.	155		17	EST-GOT-ADH-AMP-PRX-6-PGD-SOD
	B.O.S.	156		18	EST-GOT-ADH-AMP-PRX-6-PGD-SOD
	B.O.S.	157		18	EST-GOT-ADH-AMP-PRX-6-PGD-SOD
	B.O.S.	158		18	EST-GOT-ADH-AMP-PRX-6-PGD-SOD
	B.O.S.	159		18	EST-GOT-ADH-AMP-PRX-6-PGD-SOD
	B.O.S.	160		18	EST-GOT-ADH-AMP-PRX-6-PGD-SOD
	B.O.S.	161		18	EST-GOT-ADH-AMP-PRX-6-PGD-SOD
	B.O.S.	162		18	EST-GOT-ADH-AMP-PRX-6-PGD-SOD
	B.O.S.	163		18	EST-GOT-ADH-AMP-PRX-6-PGD-SOD
B.O.S.	164	18	EST-GOT-ADH-AMP-PRX-6-PGD-SOD		
B.O.S.	165	18	EST-GOT-ADH-AMP-PRX-6-PGD-SOD		
<i>P. alba</i> Grisebach	R.A.P.	315	Formosa: Dpto. Patiño (Estancia La Primavera)	50	EST-GOT-ADH-AMP-PRX-6-PGD-SOD
	R.A.P.	317		43	EST-GOT-ADH-AMP-PRX-6-PGD-SOD
	R.A.P.	323		42	EST-GOT-ADH-AMP-PRX-6-PGD-SOD
	R.A.P.	329		43	EST-GOT-ADH-AMP-PRX-6-PGD-SOD
	R.A.P.	330		50	EST-GOT-ADH-AMP-PRX-6-PGD-SOD

(CONTINUA)

Tabla 1. CONTINUACION

ESPECIE	COLECTOR*	N° COLECC.*	LOCALIDAD	Cant. de* Semillas	Sistemas enzimáticos analizados* en cada muestra	
<i>P. alba</i>	R.A.P.	488		29	EST-GOT-ADH-AMP-PRX-6-PGD-SOD	
	R.A.P.	464		43	EST-GOT-ADH-AMP-PRX-6-PGD-SOD	
<i>P. hassleri</i> Harms			<u>Formosa:</u> Dpto. Patiño. (Estancia La Primavera)			
	R.A.P.	311		44	EST-GOT-ADH-AMP-PRX-6-PGD-SOD	
	R.A.P.	316		44	EST-GOT-ADH-AMP-PRX-6-PGD-SOD	
	R.A.P.	320		43	EST-GOT-ADH-AMP-PRX-6-PGD-SOD	
	R.A.P.	322		50	EST-GOT-ADH-AMP-PRX-6-PGD-SOD	
	R.A.P.	325		50	EST-GOT-ADH-AMP-PRX-6-PGD-SOD	
	R.A.P.	327		47	EST-GOT-ADH-AMP-PRX-6-PGD-SOD	
	R.A.P.	462		11	EST-GOT-ADH-AMP-PRX-6-PGD-SOD	
	R.A.P.	480		11	EST-GOT-ADH-AMP-PRX-6-PGD-SOD	
<i>P. nigra</i> Grisebach			<u>Santiago del Estero:</u> Dpto. La Banda. Dique Los Quiroga			
	B.O.S.	139		42	EST-GOT-ADH-AMP-PRX-6-PGD-SOD	
	B.O.S.	140		43	EST-GOT-ADH-AMP-PRX-6-PGD-SOD	
	B.O.S.	141		50	EST-GOT-ADH-AMP-PRX-6-PGD-SOD	
	B.O.S.	142		50	EST-GOT-ADH-AMP-PRX-6-PGD-SOD	
	B.O.S.	143		30	EST-GOT-ADH-AMP-PRX-6-PGD-SOD	
	B.O.S.	144		33	EST-GOT-ADH-AMP-PRX-6-PGD-SOD	
	B.O.S.	145		32	EST-GOT-ADH-AMP-PRX-6-PGD-SOD	
				<u>Entre Ríos:</u> Dpto. Paraná Parque San Martín		
	C.A.N.	358			43	EST-GOT-ADH-AMP-PRX-6-PGD-SOD (CONTINUA)

Tabla 1. CONTINUACION

ESPECIE	COLECTOR * N° COLECC. *	LOCALIDAD	Cant. de semillas	Sistemas enzimáticos analizados en cada muestra *
<i>P. nigra</i>	C.A.N. 359		43	EST-GOT-ADH-AMP-PRX-6-PGD-SOD
	C.A.N. 431		20	EST-GOT-ADH-AMP-PRX-6-PGD-SOD
	C.A.N. 432		27	EST-GOT-ADH-AMP-PRX-6-PGD-SOD
	C.A.N. 434		56	EST-GOT-ADH-AMP-PRX-6-PGD-SOD
	C.A.N. 435		55	EST-GOT-ADH-AMP-PRX-6-PGD-SOD
	C.A.N. 438		56	EST-GOT-ADH-AMP-PRX-6-PGD-SOD
<i>P. caldenia</i> Burkart		La Pampa: Santa Rosa, Escuela la Agrotécnica	30	EST-GOT-ADH-AMP-PRX-6-PGD-SOD
	SEZ-BOS 118		28	EST-GOT-ADH-AMP-PRX-6-PGD-SOD
	SEZ-BOS 119		25	EST-GOT-ADH-AMP-PRX-6-PGD-SOD
	SEZ-BOS 120		29	EST-GOT-ADH-AMP-PRX-6-PGD-SOD
	SEZ-BOS 121		29	EST-GOT-ADH-AMP-PRX-6-PGD-SOD
	SEZ-BOS 123		27	EST-GOT-ADH-AMP-PRX-6-PGD-SOD
	SEZ-BOS 124		32	EST-GOT-ADH-AMP-PRX-6-PGD-SOD
	SEZ-BOS 125		20	EST-GOT-ADH-AMP-PRX-6-PGD-SOD
	SEZ-BOS 126			
			Dpto. Utracan Chacharramendi	29
<i>P. flexuosa</i> De Candolle	SEZ-BOS 104		29	GOT
	SEZ-BOS 115		29	GOT
	SEZ-BOS 116		29	GOT
	SEZ-BOS 117		43	GOT
	SEZ-BOS 100		29	GOT
	SEZ-BOS 103		35	GOT
	SEZ-BOS 105		32	GOT
SEZ-BOS 106		14	GOT	
SEZ-BOS 107		14	GOT	

(CONTINUA)

Tabla 1. CONTINUACION

ESPECIE	COLECTOR*	N° COLECC.*	LOCALIDAD	Cant. de semillas*	Sistemas enzimáticos analizados en cada muestra*
<i>P. flexuosa</i>			Dpto. Cura-Có Salar La Amarga		
	SEZ-BOS	127		37	EST-GOT-ADH-AMP-PRX-6-PGD-SOD
	SEZ-BOS	128		22	EST-GOT-ADH-AMP-PRX-6-PGD-SOD
	SEZ-BOS	129		30	EST-GOT-ADH-AMP-PRX-6-PGD-SOD
	SEZ-BOS	131		25	EST-GOT-ADH-AMP-PRX-6-PGD-SOD
	SEZ-BOS	132		19	EST-GOT-ADH-AMP-PRX-6-PGD-SOD
	SEZ-BOS	133		34	EST-GOT-ADH-AMP-PRX-6-PGD-SOD
	SEZ-BOS	135		29	EST-GOT-ADH-AMP-PRX-6-PGD-SOD
	SEZ-BOS	136		30	EST-GOT-ADH-AMP-PRX-6-PGD-SOD
<i>P. alpataco</i> Philippi			Dpto. Utracán Chacharramendi		
	SEZ-BOS	101		51	EST-GOT-ADH-AMP-PRX-6-PGD-SOD
	SEZ-BOS	102		60	EST-GOT-ADH-AMP-PRX-6-PGD-SOD
	SEZ-BOS	108		69	EST-GOT-ADH-AMP-PRX-6-PGD-SOD
	SEZ-BOS	109		50	EST-GOT-ADH-AMP-PRX-6-PGD-SOD
	SEZ-BOS	111		50	EST-GOT-ADH-AMP-PRX-6-PGD-SOD
	SEZ-BOS	112		45	EST-GOT-ADH-AMP-PRX-6-PGD-SOD
	SEZ-BOS	170		25	EST-GOT-ADH-AMP-PRX-6-PGD-SOD
	SEZ-BOS	171		25	GOT
<i>P. vinalillo</i> Stuckert			Chaco: Dpto. Güemes		
	R.A.P.	493	Ruta Nacional N°95	40	GOT-ADH
	R.A.P.	500		40	GOT-ADH
			Formosa: Depto. Patiño		
	R.A.P.	483	(Estancia La Primavera)	40	GOT-ADH

(CONTINUA)

Tabla 1. Continuación

ESPECIE	COLECTOR*	N° COLECC.*	LOCALIDAD	Cant. de Semillas*	Sistemas enzimáticos analizados* en cada muestra
<i>P. reptans</i> Bentham	B.O.S.	166 (representativo de c.a. 100 individuos)	<u>Santiago del Estero:</u> Dpto. Avellaneda Herrera.	240	EST-GOT-ADH-AMP-PRX-6-PGD-SOD
<i>P. strombulifera</i> Bentham	A.D.B.	19 (representativo de c.a. 30 individuos)	<u>Río Negro:</u> Dpto. Conesa Gral. Conesa	240	EST-GOT-ADH-AMP-PRX-6-PGD-SOD
	J.H.H.	9563 (representativo de varios individuos)	<u>Catamarca:</u> Dpto. de Tinogasta 3km. al S. de Copacabana	240	EST-GOT-ADH-AMP-PRX-6-PGD-SOD
afín a <i>P. alba</i>	B.O.S.	167	<u>Santiago del Estero:</u> Dpto. La Banda Dique Los Quiroga	20	EST-GOT-ADH-AMP-PRX-6-PGD-SOD (CONTINUA)

Tabla 1. Continuación

ESPECIE	COLECTOR* N° COLECC.*	LOCALIDAD	Tant.de* semillas	Sistemas enzimáticos analizados* en cada muestra
afín a <i>P. alba</i>	B.O.S. 168 B.O.S. 169	Catamarca Dpto. Andalgalá Andalgalá	20 20	EST-GOT-ADH-AMP-PRX-6-PGD-SOD EST-GOT-ADH-AMP-PRX-6-PGD SOD
<i>P. alba</i> x <i>P. flemuosa</i>	O.T.S. 4219	La Pampa: Dpto. Utracán Chacharramendi	50	EST-GOT-ADH-AMP-PRX-6-PGD-SOD
<i>P. flemuosa</i> x <i>P. alpataco</i>	SEZ-BOS 110 SEZ-BOS 113 SEZ-BOS 114	Formosa: Dpto. Patiño Ruta Nacional N°95	20 20 20	EST-GOT-ADH-AMP-PRX-6-PGD-SOD EST-GOT-ADH-AMP-PRX-6-PGD-SOD EST-GOT-ADH-AMP-PRX-6-PGD-SOD
afín a <i>P. hassleri</i>	R.A.P. 316		20	EST-GOT-ADH-AMP-PRX-6-PGD-SOD
<i>P. ruscifolia</i> x <i>P. hassleri</i>	R.A.P. 326 R.A.P. 479		20 20	EST-GOT-ADH-AMP-PRX-6-PGD-SOD EST-GOT-ADH-AMP-PRX-6-PGD-SOD
<i>P. hassleri</i> x <i>P. alba</i>	R.A.P. 311		20	EST-GOT-ADH-AMP-PRX-6-PGD-SOD (CONT INUA)

Tabla 1. Continuación

ESPECIE	COLECTOR*	N° COLECC.*	LOCALIDAD	Cant.de* semillas	Sistemas enzimáticos analizados* en cada muestra
<i>P. hassleri</i> x	R.A.P.	312		20	EST-GOT-ADH-AMP-PRX-6-PGD-SOD
<i>P. alba</i>	R.A.P.	318		20	EST-GOT-ADH-AMP-PRX-6-PGD-SOD
	R.A.P.	sin N°		20	EST-GOT-ADH-AMP-PRX-6-PGD-SOD
<i>P. nigra</i> x					
<i>P. hassleri</i>	R.A.P.	319		20	EST-GOT-AMP-PRX-PRX-6-PGD-SOD

\*Referencias: J.H.H.: Juan H. Hunziker; C.A.N.: Carlos A. Naranjo; R.A.P.: Ramón A. Palacios; S.E.Z.: Silvia E. Zeiger; ADB: Alicia D. Burghardt; O.T.S.: Otto T. Solbrig; B.O.S.: Beatriz O. Saidman.  
 EST: Esterasa; GOT: Glutamato oxalacetato transaminasa; ADH: Alcohol dehidrogenasa; AMP: Aminopeptidasa; PRX: Peroxidasa; 6-PGD: 6-Fosfogluconato dehidrogenasa; SOD: Superóxido dismutasa  
 N° Colecc.: Número de colección  
 Cant.de semillas: Cantidad de semillas estudiadas.

NOTA: A lo largo del texto y en las tablas correspondientes, las localidades de colección indicadas en la figura 1 se denominaron de la siguiente manera: Especies de la Sección Algarobia: A) Copo; B) Avellaneda; C) Santiago del Estero; D) Santa Rosa; E) Chacharramendi; F) Cura-Có; G) Formosa; H) Entre Ríos; I) Chaco.  
 Para las especies de la Sección Strombocarpa los nombres usados fueron: B) Santiago del Estero; J) Catamarca y L) Río Negro.

Figura 1. Localidades donde se coleccionaron las poblaciones de especies de Prosopis.

- A) Santiago del Estero: Dpto. Copo, Monte Quemado.
- B) Santiago del Estero: Dpto. Avellaneda, Herrera.
- C) Santiago del Estero: Dpto. La Banda, Dique Los Quiroga.
- D) La Pampa: Santa Rosa, Escuela Agrotécnica.
- E) La Pampa: Dpto. Utracán, Chacharramendí.
- F) La Pampa: Dpto. Cura-Có, Salar La Amarga.
- G) Formosa: Dpto. Patiño, Estancia La Primavera.
- H) Entre Ríos: Dpto. Paraná, Parque San Martín.
- I) Chaco: Dpto. Guemes, Ruta Nacional N° 95.
- J) Catamarca: Dpto. Tinogasta, 3 km. al sur de Copacabana.
- K) Catamarca: Dpto. Andalgalá, Andalgalá.
- L) Río Negro: Dpto. Conesa, Gral. Conesa.



la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Buenos Aires (BAFC), a excepción del N° 4219 que se encuentra en el Gray Herbarium (GH), Harvard University, y que fue coleccionado por el Profesor Otto Solbrig.

#### Colección y conservación del material.

Los arbustos se encuentran en las diferentes localidades formando / en muchos casos montes impenetrables que se extienden cientos de kilómetros. Dado que el polen no se desplaza grandes distancias y que se cree que la mayoría de las especies de la Secc. Algarobia son de fecundación cruzada obligada (Ver Página 13 ), los frutos fueron coleccionados de árboles seleccionados dentro de áreas de por lo menos 100 ha. y separados unos de otros // unos 500 a 600 m. de modo que pudieran considerarse aislados entre sí. Los árboles de origen híbrido fueron coleccionados en zonas periféricas, donde las especies puras se solapaban, y suficientemente alejadas de donde fueron coleccionados los árboles que no mostraban indicios de hibridación.

Por lo tanto, a pesar de que el número de árboles de algunas poblaciones muestreadas no es abundante, dadas las características reproductivas y de distribución se considera que las muestras obtenidas son representativas de las poblaciones estudiadas.

Se coleccionaron 50 a 100 vainas de cada árbol. Ellas fueron puestas en el congelador (-20°C) durante 72 horas para matar así las larvas de los insectos que se alimentan de los frutos y semillas de estas plantas. Luego / las vainas fueron colocadas en bolsas de papel y guardadas en una cámara // fría a 4°C o a temperatura ambiente con naftalina para evitar el ataque por polillas (modificado de Felker, 1983).

La conservación de las semillas en la cámara fría tiene la ventaja / de evitar la pérdida de viabilidad de las mismas por muchos años.

### Obtención de las semillas y método de germinación

Las vainas fueron trituradas en una licuadora regulando manualmente// la velocidad y el tiempo, para evitar que este tratamiento pudiera dañar las semillas. De esta manera la vaina se rompe y se separan los artejos.

Los artejos fueron pasados por un sistema de 3 cribas con diferente// malla para separarlos de los restos de las vainas. Finalmente aquéllos se guardaron en sobres de papel a 4°C en frascos con sílica gel.

Las semillas fueron extraídas de los artejos en el momento de su uso, partiendo los mismo mediante un alicate.

Para que se produzca la germinación es necesario efectuar un desgaste de la cutícula para facilitar así el intercambio de gases y la penetración / de agua. Esto se realizó por dos métodos: cuando las semillas eran grandes, / simplemente se las escarificaba lijándolas, pero cuando eran muy pequeñas se las colocaba 1 1/2 minutos en ácido sulfúrico, lavándolas luego profusamente / con agua corriente.

Una vez escarificadas con cualquiera de los dos métodos, las semillas fueron colocadas en cajas de Petri que contenían una capa de algodón muy fina embebido en agua y por encima de la misma un papel de filtro. Se las dejaba / luego con luz continua durante un mínimo de 16 hs., a 30°C. Luego de ese pe- / ríodo se verificó la aparición del hipocótilo.

### Elección de los sistemas Isoenzimáticos

Cuando se realizó el plan de investigación, se consideró estudiar diferentes sistemas isoenzimáticos. Ellos fueron: fosfoglucomutasa, fosfogluco- isomerasa, malato dehidrogenasa, fosfatasas ácida y alcalina, catalasa, 6-fos- fogluconato dehidrogenasa, peroxidasa, esterasa, alcohol dehi-//

drogenasa, superóxido dismutasa, aminopeptidasa y glutamato oxalacetato /// transaminasa. Para todos estos sistemas se utilizó una gran diversidad de / condiciones tratando de lograr una buena nitidez de las bandas. Se usaron// diferentes tampones para la obtención de los extractos, para la preparación de los geles y para las cubas de corrida electroforética; diferentes sistemas de revelado para las diferentes isoenzimas, e inclusive se efectuaron / preincubaciones para cambiar el pH del sistema del revelado. Así, se esco- / gieron los métodos que dieron los mejores resultados, y se descartaron aqué- llos que daban bandas difusas.

Luego de las pruebas iniciales se decidió no utilizar los sistemas/ fosfoglucomutasa, fosfoglucoisomerasa, malato dehidrogenasa, catalasa y fos- fatasas ácida y alcalina. Las tres primeras por ser excesivamente costosas/ y las tres últimas por no obtener bandas con buena resolución.

La elección de los tampones se realizó siempre usando P.ruscifolia/ (Formosa), y generalmente se obtenía el mismo poder de resolución de las // bandas en las demás especies. Solamente las peroxidásas presentaban varia- / ción en su nitidez al analizar distintas especies.

### Electroforesis

Se estudió un total de alrededor de 4.900 individuos. En todas las / especies se analizaron las semillas 24 hs. después de iniciada la germina- / ción y los cotiledones epicótilos e hipocótilos de plántulas de distintas / edades. En algunos casos se analizaron también las primeras hojas adultas./ Dado que para diferentes sistemas isoenzimáticos era necesario utilizar dis- / tintos tampones y a veces distintos órganos, un mismo individuo en general/ no podía ser usado para más de un sistema isoenzimático.

La técnica utilizada fue electroforesis horizontal en geles de almi-

dón y de poliacrilamida.

1) Preparación de los geles de poliacrilamida.

Se utilizaron geles al 5 % y al 7 %. Los primeros fueron preparados de la siguiente manera:

Tampón .....	105	ml.
Cyanogum 41 .....	5.35	g.
(TEMED) diamina de N,N,N,N' -		
Tetrametiletileno .....	0.08	ml.
(AP) Persulfato de amonio (10%) .....	0.8	ml.

Los geles al 7 % se prepararon usando:

Tampón .....	105	ml.
Cyanogum 41 .....	7.35	g.
(TEMED) diamina de N,N,N,N' -		
Tetrametiletileno .....	0.14	ml.
(AP) Persulfato de Amonio .....	0.90	ml.

Los tampones utilizados variaron según el sistema isoenzimático analizado:

A) PEROXIDASA (PRX), ESTERASA (EST) y SUPEROXIDO DISMUTASA. (SOD)

Tampón Tris-Citrato pH.7.4:

Acido cítrico .....	1.537	g.
Tris(Hidroximetil)aminometano .....	3.683	g.
Agua .....	2.000	ml.

B) AMINOPEPTIDASA (AMP)

Tampones A y B (Scandalios, 1969 modificado) pH 7.4 (0.2 M) en una /  
proporción 1A:9B (S.Cavalli, com. pers.).

\*Tampón A (Borato de Litio pH 7.4):

Hidróxido de Litio .....	0.479	g.
Acido Bórico anhidro .....	13.602	g.
Agua .....	1.000	ml.

\*Tampón B (Tris-Citrato pH 7.4):

Tris .....	5.510	g.
Acido Cítrico anhidro .....	2.593	g.
Agua .....	1.000	ml.

C) GLUTAMATO OXALACETATO TRANSAMINASA (GOT)

Tampones A y B Scandalios (1969) pH 8.3 (0.2M) en una proporción//  
1A:9B.

\*Tampón A (Borato de Litio pH 8.3):

Hidróxido de Litio .....	1.200 g.
Acido Bórico Anhidro .....	11.890 g.
Agua .....	1 000 ml.

\*Tampón B (Tris-Citrato pH 8.3):

Tris .....	6.200 g.
Acido Cítrico anhidro .....	1.600 g.
Agua .....	1 000 ml.

Una vez preparada la solución correspondiente al sistema a analizar/ se volcaba en una cubeta de vidrio con las siguientes dimensiones: 5 cm. de ancho por 17 cm. de largo y 0.2 cm. de espesor. Esta se cubría con una placa de vidrio y se mantenía el sistema a temperatura ambiente durante 20 minutos para permitir la polimerización. Luego de este tiempo se transfería a una heladera a 4°C y se la mantenía en ella durante 2 hs.

## II) Preparación de los geles de almidón

Se utilizaron geles de almidón al 13 %. Los geles fueron preparados de la siguiente manera:

Almidón (Connaught) .....	15.600 g.
Tampón .....	120 ml.

Los tampones utilizados varían según el sistema isoenzimático anali  
zado:

A) ALCOHOL DEHIDROGENASA (ADH)

\*Tampón: Tris-Cítrico pH 7 (Shaw y Prasad, 1970)

Tris.....	16.350	g.
Acido Cítrico.....	9.040	g.
Agua.....	1 000	ml.

Se diluye 66,7 ml. del tampón en 1000 ml. de agua (Shaw y Prasad, 1970).

B) 6-FOSFOGLUCONATO DEHIDROGENASA (6-PGD)

\*Tampón: Dehidrogenasa pH 9 (Schaal y Anderson, 1974)

Tris.....	42.160	g.
Acido Bórico .....	1.080	g.
EDTA .....	1.640	g.
Agua .....	4 000	ml.

La preparación del gel se realizó de la siguiente manera: se coloca el almidón en un erlemeyer de 500 ó 1000 ml. mezclando vigorosa y continuamente sobre una llama fuerte, utilizando guantes de amianto para proteger las manos del calor. La solución se calentaba hasta que comenzaba a estrar en ebullición (aparición de burbujas). En ese instante se retiraba el erlemeyer del fuego y se sometía la solución a vacfo, utilizando para ello/ una bomba de vacfo. De esta manera se extrafa el aire que quedaba en la so-

lución. Inmediatamente después se volcaba la misma en cubetas con las mismas características descritas para los geles de la poliacrilamida y se dejaba enfriar a temperatura ambiente, colocándolos luego en heladera. El tiempo total de enfriamiento fue de aproximadamente una hora, luego de la cual los geles fueron utilizados.

#### Preparación de la muestra

Para el sistema de ADH se utilizaron semillas con 24 horas de inicia da la germinación, momento en que el hipocótilo tiene aproximadamente 2 mm. de longitud y el tegumento todavía no se ha caído. Los demás órganos analizados no presentaban para éste sistema clara resolución de las bandas o directamente no mostraban actividad ADH.

Para las PRX se utilizaron cotiledones, epicótilos, hipocótilos y / primera hoja adulta, no encontrándose actividad en semillas de 24 hs. de ger minación.

En el resto de los sistemas se observó actividad enzimática en todos los órganos y estadios analizados.

Dado el tamaño considerablemente grande de los cotiledones de algunas especies, en muchos casos sólo se utilizó uno de ellos, usando posteriormente el otro para estudiar otro sistema o se permitió que la plántula continuara su desarrollo normal con un solo cotiledón, para estudiar aproximadamente 13 días más tarde la primera hoja adulta.

Los homogenatos de los diferentes tejidos fueron obtenidos por macera ción de los mismos en el correspondiente tampón de extracción según el sistema a analizar. Este procedimiento fue realizado a 0°C en placas de acrílico, con concavidades de 1 cm. de diámetro y 0.5 cm. de profundidad o/

en "placas de toque".

En estas concavidades se colocaba la muestra en 0.5 ml. de tampón / del gel, para ADH, ó 0.5 ml. Tris-ClH pH 7.1 (0.1M), para el resto de los / sistemas isoenzimáticos.

La trituración del material se realizó con una varilla de vidrio o / plástico de extremo redondeado.

El homogenato fue absorbido en papel Whatmann 3MM. de 2x4 mm, para / ADH, SOD, PRX, 6-PGD y GOT y de 2 mm x 1 cm, para EST y AMP.

#### Siembra del material en los geles

Para insertar los papeles de filtro embebidos en el homogenato se / realizaron orificios en el gel mediante un peine de acero inoxidable con 20 / dientes de 4 mm. (de ancho) x 2 mm. (de espesor). De esta forma se obtenían / hendiduras espaciadas regularmente y alineadas, donde se colocaban las mues- / tras (papeles de 2 mm x 4 mm.). En los casos en que se necesitaban hendidu- / ras más largas (papeles de 2mm. x 1 cm.) se las realizaba con una espátula / del ancho requerido, utilizando una regla para que los orificios resultasen / alineados.

Como todas las bandas obtenidas para todos los sistemas eran de mi- / gración anódica, las muestras se sembraban aproximadamente a 4 cm. del ex- / tremo correspondiente del cátodo.

En todos los geles se colocaba una muestra testigo, P.ruscifolia / (710), y un papel embebido en una solución de bromo fenol, que presenta un / intenso color azul, y provee un punto de referencia para estimar la posición / aproximada de las enzimas durante la corrida electroforética.

### Corrida electroforética

Los geles fueron sometidos a un campo eléctrico en cubas electroforéticas de acrílico construídas en nuestro laboratorio. Cada cuba tenía capacidad para dos geles. Las corridas se efectuaban en una heladera a 4°C y los geles se cubrían con un papel plástico autoadherente para evitar la evaporación por encima del cual se colocaba una placa de vidrio y finalmente / una bandeja con hielo. La corrida electroforética era detenida cuando el frente de bromo fenol migraba aproximadamente 6 cm. desde el punto de siembra.

### Tampones utilizados en las cubas electroforéticas.

#### A) ESTERASA, PEROXIDASA y SUPEROXIDO DISMUTASA.

\*Tampón Borato de Sodio pH 8.7

Acido Bórico.....	37.200 g.
Hidróxido de Sodio.....	8.000 g.
Agua.....	2 000 ml.

#### B) AMINOPEPTIDASA

Se utilizó el tampón A pH 7.4 (0.2M) descrito en la página 36 .

#### C) GLUTAMATO OXALACETATO TRANSAMINASA

Se utilizó el tampón A Scandalios (1969) pH 8.3 (0.2M) descrito en la página 36.

D) ALCOHOL DEHIDROGENASA

Fue utilizado el tampón Tris-Cítrico pH 7 descrito en la página 38

E) 6-FOSFOGLUCONATO DEHIDROGENASA

Se utilizó el mismo tampón descrito para la preparación de los geles (Pág. 38).

Revelado y fijación de los geles

A) ESTERASA

Los geles fueron sumergidos en la siguiente solución:

Tris ClH pH 6 (0.1M) .....	100 ml.
Fasta Blue RR Salt .....	0,05 g.
Solución de éster al 1 % en acetona .....	2 ml.

Los ésteres empleados fueron:

Acetato de $\alpha$ naftilo	( $\alpha$ NA)
Acetato de $\beta$ naftilo	( $\beta$ NA)
$\alpha$ NA + $\beta$ NA	(Mezcla)
Propionato de $\alpha$ naftilo	( $\alpha$ NP)
Estearato de $\alpha$ naftilo	( $\alpha$ NS)
Butivato de $\alpha$ naftilo	( $\alpha$ NB)
Laurato de $\alpha$ naftilo	( $\alpha$ NL)

Menistato de  $\alpha$  naftilo (  $\alpha$  NM)  
Oleato de  $\beta$  naftilo (  $\beta$  NO)

Posteriormente se colocó el gel en una estufa a 37°C y en aproximadamente 30 min. aparecían las bandas. Si estas últimas reaccionaban con  $\beta$ NA presentaban color rojo, mientras que si reaccionaban con el resto de los // sustratos eran de color marrón.

El gel se fijó luego en 5:5:1 (Agua:Metanol:Acido Acético).

#### B) PEROXIDASA

Los geles fueron pincelados con la siguiente solución:

Agua Oxigenada 0.02 % .....	3 ml.
Solución de Benzidina-C1H .....	3 ml.

La solución de Benzidina-C1H se preparaba de la siguiente manera: / 1 g. de benzidina-C1H disuelto en 9 ml. de Acido Acético a 50°C y posteriormente se agregaban 36 ml. de Agua.

Luego del revelado, los geles se fijaron en una solución de acético / al 0,25 % pero debían fotografiarse inmediatamente porque las bandas comenzaban a desaparecer al poco tiempo.

#### C) SUPEROXIDO DISMUTASA

Los geles fueron incubados en la siguiente solución:

Tampón Tris-C1H 0. M pH: .5 .....	100 ml.
Nitro Blue Tetrazolium .....	0.020 g.

Nicotinamida dinucleótido.....	0.025 g.
Metasulfato de fenazina.....	0.005 g.

El gel se mantuvo aproximadamente 24 hs. bajo una luz intensa. Esto se logró iluminando el gel con dos lámparas de 40W rodeadas con papel aluminio para concentrar la luz. Durante este tiempo de incubación el gel era // mantenido cubierto con un papel plástico autoadherente, para evitar la evaporación de la mezcla de revelación.

Las bandas que aparecen son negativas, es decir blancas sobre un // fondo azul.

Los geles fueron fijados 15 min. en ácido acético al 2 %, luego se enjuagaron en agua corriente y se conservaron envueltos en papel plástico// autoadherente.

D) AMINOPEPTIDASAS (Schaal y Anderson, 1974)

Luego de la corrida electroforética el gel fue incubado en ácido / bórico 0.5 M por 1 hora. Posteriormente se lo lavó con agua destilada y se lo sumergió en la siguiente solución:

Solución A .....	50 ml.
Solución B .....	10 ml.
Sustrato .....	0.070 g
Fasta Black K Salt .....	0.030 g

Solución A:

Hidróxido de Sodio.....	8.000 g
-------------------------	---------

Acido Maleico anhido .....	19.600 g.
Agua .....	1 000 ml.

Solución B:

Hidróxido de Sodio .....	12.800 g.
Agua.....	1 000 ml.

Sustratos:

- A) Clorhidrato de p-nitroanilida de N- $\alpha$ -benzoil-DL-arginina.
- B) Clorhidrato de  $\beta$ -naftilamida de 4-metoxi-L-leucina.
- C) Clorhidrato de  $\beta$ -naftilamida de N- $\alpha$ -benzoil-DL-arginina.
- D) Clorhidrato de  $\beta$ -naftilamida de L-leucina.

Luego el gel se puso en estufa a 37°C, apareciendo en aproximadamente 45 minutos las bandas violetas.

El gel se fijó en 5:5:1 (Agua:metanol:ácido acético)

- E) GLUTAMATO OXALACETATO TRANSAMINASA (Sugerencia de la Lic. S.Cavalli, Universidad de Porto Alegre)

El gel fue sumergido en una solución que presentaba los siguientes componentes:

Tampón fosfato (.....) pH .....	50 ml.
Fast Blue BB Salt o.....	0.150 g.
Fast Violet	
Piridoxal-5-fosfato .....	0.001 g.

Acido <u>L</u> aspártico.....	0.226	g.
Acido <u>L</u> cetoglutárico.....	0.037	g.
Polivinilpirrolidona .....	0.125	g.

Tampón Fosfato (0.1 M) pH 7.

Fosfato de sodio monobásico 0.1 .....	1	ml.
Fosfato de sodio dibásico 0.1 .....	1	ml.

El gel luego se incubó en oscuridad a 37°C durante media hora, apareciendo posteriormente las bandas de color violeta. El gel se fijó en /// 5:5:1 (Agua:metanol:ácido acético).

F) ALCOHOL DEHIDROGENASA (Shaw y Prasad, 1970)

La solución de revelado fue la siguiente:

Tris-C1H 0.1, pH .....	15	ml.
Agua .....	77	ml.
Etanol .....	3	ml.
NaCN (0.1M) .....	5	ml.
Nicotinamida-adenina-dinucleótido (NAD) ...	0,050	g.
Nitro blue tetrazolium (NBT) .....	0.030	g.
Metasulfato de fenacina (PMS) .....	0.002	g.

Luego el gel se puso en estufa a 37°C y en aproximadamente una hora aparecían las bandas azules. El gel se fijó en 5:5:1 (Agua:metanol:ácido // acético).

G) 6-FOSFOGLUCONATO DEHIDROGENASA (Schaal y Anderson, 1974)

Se preparó la siguiente solución:

Tris-ClH M, pH .....	15	ml.
Acido 6-fosfogluconico.....	0.040	g.
Fosfato de nicotinamina-adenina-dinucleotido. (NADP)	0.020	g.
MTT .....	0.025	g.
Metasulfato de fenacina (PMS).....	0.002	g.

Se combinó esta solución con 15 ml. de agar al 2 %, se cubrió el gel y se incubó a 37°C en oscuridad hasta que aparecieron las bandas de color / azul. El gel se fijó en 5:5:1 (Agua:metanol:ácido acético).

Métodos utilizados para la determinación de los posibles loci y sus alelos.

El método experimental que permite determinar el número de loci génicos y el de los alelos por locus consiste en efectuar cruzamientos a partir de individuos heterocigotas para cada locus y observar su transmisión y segregación. Esto es prácticamente irrealizable en Prosopis debido al largo ciclo de vida de estas especies. Por lo tanto la determinación está basada/ en:

- a) Comparación de la velocidad de migración relativa: La misma velocidad de migración relativa es un indicio de homologías entre bandas. Existe cierta/ limitación en este criterio ya que pueden haber diferentes isoenzimas con / la misma velocidad de migración.
- b) Comparación de los patrones de diferentes individuos de cada población y

entre poblaciones, Las especies aquí estudiadas son diploides (Hunziker et al., 1975, 1977) y tendrían fecundación cruzada (Simpson, 1977; Simpson y Solbrig, 1977), por lo tanto sólo existirían dos alelos por cada locus en un individuo y se pueden encontrar individuos homocigotas y heterocigotas.

c) La aparición o desaparición de bandas y variación de sus intensidades a lo largo del desarrollo de un individuo, permiten postular los posibles genes implicados en la producción de ciertas isoenzimas, ya que se espera // que los alelos estén sujetos al mismo sistema de regulación y, por lo tanto, sufran las mismas modificaciones a lo largo del desarrollo (Ohno, 1970; Smith-Cavalli, 1976; Zouros et al., 1982)

d) Reacción de ciertas isoenzimas ante diferentes sustratos in vitro; las isoenzimas codificadas por alelos de un gen deben reaccionar de igual forma frente a cada sustrato (Zouros et al., 1968; Scandalios y Espiritu, 1979; Mac Donal y Brewbaker, 1972 b).

e) La igualdad en la variación de la velocidad de migración relativa de // las bandas al cambiar la concentración del soporte (cambio de tamaño del / poro del gel) sería indicio de homología, ya que podría estar indicando si millitud en el tamaño molecular de las isoenzimas.

f) El estudio de semillas provenientes de presuntos híbridos naturales permite observar segregantes en su descendencia, que a pesar de no provenir / de cruzamientos controlados, darían información referente a homologías // isoenzimáticas comparable (con ciertas limitaciones) a la que se obtiene / de aquéllos.

Quantificación de la variabilidad genética y estimación de la similitud entre especies.

Una vez determinados los posibles loci y alelos se procedió a estudiar las frecuencias génicas y genotípicas, analizando si estas últimas se

ajustaban a los valores esperados para una población en equilibrio según // la ley de Hardy-Weinberg, mediante la prueba de  $\chi^2$ .

La variación intrapoblacional fue analizada utilizando índices diferentes:

1) Porcentaje de loci polimórficos (P):

$$P = \frac{\text{N}^\circ \text{ de loci polimórficos}}{\text{N}^\circ \text{ total de loci}} \times 100$$

2) Índice polimórfico (PI) (Hamrick, 1979) ó frecuencia media esperada de / heterocigotas por locus ( $\bar{H}$ ) (Nei, 1975):

$$PI = \frac{1}{m} \sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^n p_{ij} (1-p_{ij})$$

donde m: número de loci analizados

n: número de alelos del locus i

$p_{ij}$ : frecuencia del alelo j del locus i

PI es equivalente a la frecuencia media de heterocigotas esperados, según la ley de Hardy-Weinberg, para todos los loci examinados o  $\bar{H}$ :

$$\bar{H} = \frac{1}{m} \sum_{i=1}^m \left\{ 1 - \sum_{j=1}^n p_{ij}^2 \right\}$$

La medida relativa del grado de similitud entre poblaciones utilizada fue la Identidad genética media (Nei, 1972), que está dada por la fórmula:

$$\bar{I} = \frac{1}{m} \sum_j \frac{\sum_i x_{ij} y_{ij}}{\left\{ \sum_i x_{ij}^2 + \sum_j y_{ij}^2 \right\}^{1/2}}$$

donde  $x_{ij}$  e  $y_{ij}$  son las frecuencias del alelo  $i$  correspondientes al locus  $j$  en las poblaciones  $X$  e  $Y$  respectivamente. El valor  $\bar{I}$  varía desde 0 a 1, con  $\bar{I}=1$  cuando las frecuencias alélicas son iguales en las dos poblaciones e  $\bar{I}=0$  cuando las dos poblaciones no presentan ningún alelo en común.

Las relaciones entre poblaciones pueden también expresarse como distancias genéticas aplicando la fórmula:

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

Esta distancia es una estimación mínima de las diferencias entre condones entre dos poblaciones que se consideren (Nei, 1972).

Los datos de identidad media se volcaron en una matriz de similitud, para realizar con los mismo un análisis de agrupamiento (análisis de "clusters"). Para calcular las distancias entre los grupos se aplicó la técnica de medias no ponderadas (UPGMA). Este método considera que el valor de similitud entre la UTO (Unidad Taxonómica Operativa) candidata a incorporarse/ y el grupo o núcleo, es igual a una similitud promedio resultante de los valores de similitud entre el candidato y cada uno de los integrantes del grupo o núcleo. Si el candidato a incorporarse es un grupo o núcleo en sí mismo, el valor de similitud será un promedio de los valores de similitud entre los pares posible de UTOS provenientes uno de cada grupo o núcleo (ver: Crisci y Armengol, 1983).

Número de clasificación y designación de las enzimas.

Para cada sistema Isoenzimático se indicaron los números de clasificación de las enzimas según IUPAC-IUB (Enzyme Nomenclature, 1979). Las bandas isoenzimáticas en la mayoría de los casos fueron denominadas según las recomendaciones de IUPAC-IUB (1971).

RESULTADOS

Alcohol Dehidrogenasa E.C.1.1.1.1. (ADH)

Selección de los órganos analizados.

Se realizaron diferentes pruebas para determinar si existía variación en las diversas partes de las plántulas con respecto a la presencia e intensidad de las bandas activas y así escoger el estadio y los órganos // que serían analizados.

Se utilizaron: a) semillas 24 hs. después de iniciada la germinación, b) cotiledones de 3, 7 o más días y c) epicótilos e hipocótilos de 3, 7 o más días después de iniciada la germinación.

Sólo se usaron para los estudios semillas a las 24 hs. posteriores/ a la iniciación de la germinación, pues en ellas se observaron bandas nítidas.

En estadios posteriores a ese lapso, las bandas se hacen cada vez / más tenues y cuando la plántula tiene aproximadamente cuatro días no se observa, para el tampón utilizado en este trabajo, actividad de ADH.

Sección Algarbbia

Los individuos de las poblaciones analizadas mostraron sin excep-// ción un patrón de 3 bandas como mínimo y 6 como máximo.

1) P. ruscifolia y P. nigra:

Todos los individuos de estas especies exhibieron un patrón semejan- te de tres bandas que fueron denominadas ADH-1, ADH-1-3 y ADH-3. Esta últi- ma fue la más lenta y ADH-1-3 presentó una velocidad de migración interme-/

día entre las otras dos (Fig. 2A, muestras 1,2,11 y 14; 2B, muestra 14; 2D, muestra 4; Fig. 3, fenotipo 1).

II) P.hassleri y P.alba.

Estas especies también presentaron invariablemente patrones de 3 /// bandas que fueron denominadas ADH-2, ADH-2-3 y ADH-3. Esta última es común con las especies mencionadas previamente. ADH-2 es algo más lenta que la // banda ADH-1 de P.ruscifolia y P.nigra y ADH-2-3 tiene una movilidad intermedia entre ADH-2 y ADH-3 y presenta una intensidad de coloración mayor que / esas dos bandas (Fig. 2 A, muestras 13 y 15; 2B, muestra 15; fig. 3, fenotipo 2).

III) P.caldenia, P.alpataco y P.flexuosa

En estas tres especies se observaron individuos que presentaban patrones de 3 y 6 bandas (Fig. 2 D, muestras 1,2,3, y 5; 2 E, 1-7). Entre los primeros (3 bandas), algunos eran similares a los observados en P.ruscifolia y P.nigra (Fig. 3, fenotipo 1), otros similares a los de P.alba y P.hassleri (Fig. 3, fenotipo 2), y los restantes presentaron un patrón algo diferente cuyas bandas fueron denominadas ADH-23, ADH-23-3 y ADH-3 (Fig. 2 E, muestra 7; fig. 3, fenotipo 3). La banda ADH-3 era común con las demás especies. La ADH-23-3 tenía movilidad intermedia entre ADH-23 y ADH-3 y ADH-23/ presentaba una velocidad de migración cercana a la de ADH-2-3 (de P.alba y/ P.hassleri) (Fig. 3, fenotipo 3).

Los individuos con patrones de 6 bandas (Fig. 2 D, muestra 1; fig.3 fenotipos 4,5, y 6), presentaron todos la banda común ADH-3 a la cual algunos (fenotipo 4) sumaban las bandas ADH-1, ADH-1-2, ADH-2, ADH-1-3 y ADH-2-3, siendo ADH-1-2 intermedia entre ADH-1 y ADH-2; otros (fenotipo 6) las /

bandas ADH-2, ADH-2-23, ADH-23, ADH-2-3, ADH-23-3, siendo ADH-2-23 intermedia entre ADH-2 y ADH-23. Las bandas ADH-2-3 y ADH-23 migran tan cercanamente que muchas veces se ve una única banda ancha donde se supone que podrían estar superpuestas (Fig. 2 D, muestra 1). Finalmente, algunos individuos // (fenotipo 5) sumaban a la banda ADH-3, las bandas ADH-1, ADH-1-23, ADH-23, // ADH-1-3, ADH-23-3, siendo la banda ADH-1-23 de velocidad intermedia entre / ADH-1 y ADH-23.

#### IV) P.vinalillo.

Es una especie que se supone originada por la hibridación de P.alba / var. panta y P.ruscifolia (Burkart, 1976).

La mayoría de las semillas provenientes de árboles determinados como P.vinalillo, mostraron los siguientes patrones isoenzimáticos: a) ADH-1, ADH-1-3, ADH-3, semejantes a los observados en P.ruscifolia y P.nigra (Fig. 3 fenotipo 1), b) ADH-2, ADH-2-3, ADH-3, similares a los descritos en P.alba y P.hassleri, c) ADH-1, ADH-1-2, ADH-2, ADH-2-3, ADH-1-3- y ADH-3, semejantes a los encontrados en algunos individuos de P.flexuosa, P.alpataco y /// P.caldenia (Fig. 3, fenotipo 4) y d) tres individuos con el siguiente patrón: ADH-1, ADH-1-3, ADH-1-4, ADH-3, ADH-3-4, y ADH-4; donde ADH-4 presentó menor velocidad de migración que ADH-3; ADH-3-4 y ADH-1-4, mostraron velocidad intermedia entre ADH-3 y ADH-4 y ADH-1 y ADH-4 respectivamente (Fig. 2 C; fig. 3, fenotipo 7).

#### V) Híbridos interespecíficos.

##### a) P.hassleri x P.ruscifolia

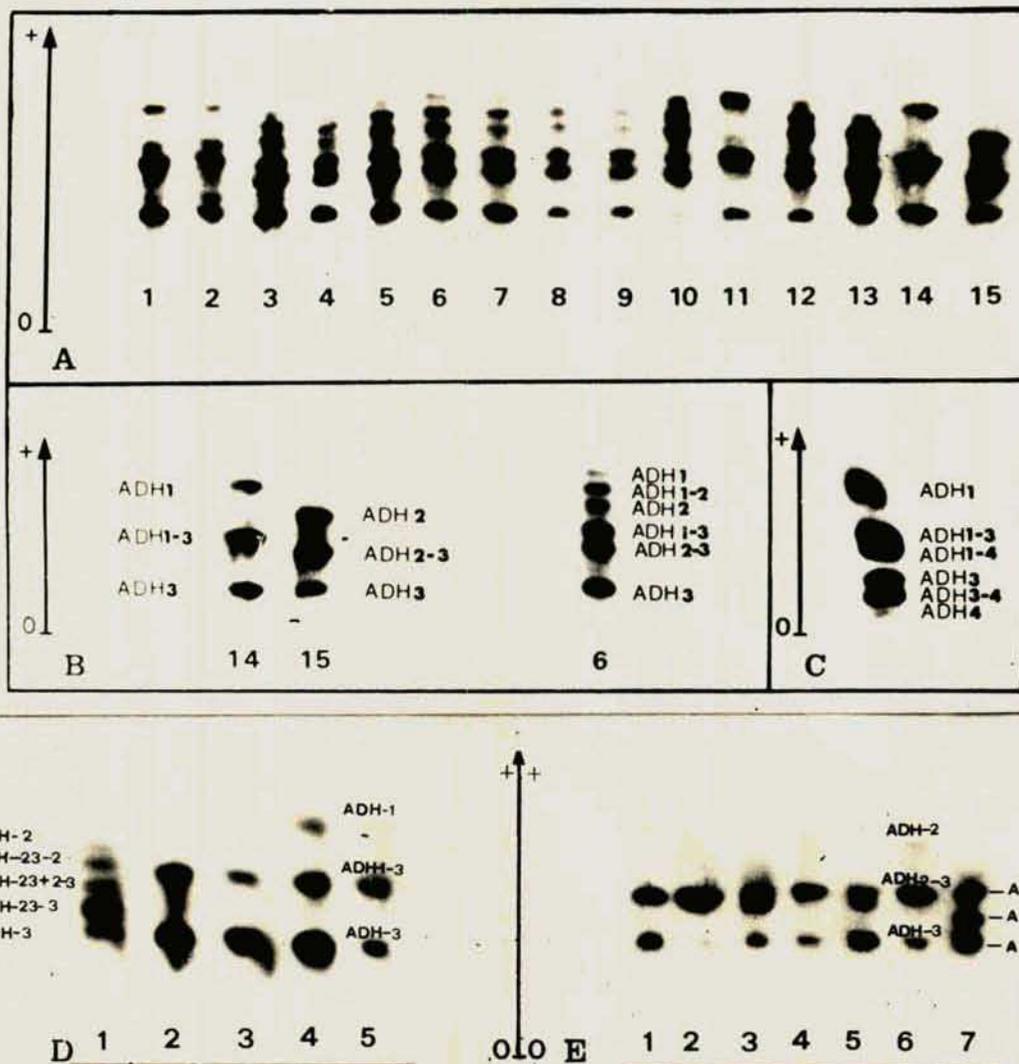


Figura 2. Zimogramas de alcohol dehidrogenasa de individuos de especies de la Sección Algarobia. A) 1, 2, 11 y 14, *P. ruscifolia* (571, 572, 576, 577); 13, *P. alba* (330); 15, *P. hassleri* (462); 3, 4, 5 y 6, *P. ruscifolia* x *P. hassleri* (479, 479, 326, 326); 7, 8, 9, 10 y 12, *P. vinalillo* (500, 500, 497, 497, 483). B) Detalle de las muestras 6, 14 y 15 del zimograma de A). C) Zimograma de *P. vinalillo* (483) presentando el alelo *Adh-2<sup>4</sup>*. D) 1 y 2, *P. flexuosa* (129, 131); 3 y 5, *P. alpataco* (111, 109); 4, *P. nigra* (358). E) 1 y 2, *P. flexuosa* (128, 132); 3 y 4, *P. alpataco* (102, 112); 5-7, *P. caldenia* (119, 120, 124).

Figura 3. Esquema indicando los siete fenotipos observados para el sistema isoenzimático de alcohol dehidrogenasa en las especies de la Sección Algarobia. Los números a la izquierda de cada banda indican la relación de intensidad esperada para cada una de ellas. Los fenotipos observados en cada especie fueron: P. nigra y P. ruscifolia: 1; P. alba y P. hassleri: 2; P. caldenia, P. alpataco y P. flexuosa: 1, 2, 3, 4, 5 y 6; semillas de híbridos P. ruscifolia x P. hassleri: 1, 2 y 4; semillas de híbridos P. alba x P. hassleri: 2; P. vinalillo: 1, 2, 4 y 7.



Se encontraron individuos con patrones de 3 bandas semejantes a /// P.hassleri y a P.ruscifolia, así como individuos de 6 bandas: ADH-1, ADH-1-2, ADH-2, ADH-1-3, ADH-2-3 y ADH-3 (Fig. 2 A y B, muestra 6; Fig. 3, fenotipo 4).

b) P.hassleri x P.alba

Sólo se observaron individuos con las bandas ADH-2, ADH-2 3 y ADH-3, características tanto de P.alba como de P.hassleri, descritas anteriormente (Fig. 3, fenotipo 2).

c) P.flexuosa x P.alba.

Sólo se estudió un árbol con estas características. Las bandas observadas en sus semillas fueron sólo ADH-2, ADH-2-3 y ADH-3 (Fig.3, fenotipo 2).

d) P.flexuosa x P.alpataco.

Los individuos analizados mostraron los mismos 6 tipos de patrones/ descriptos para los supuestos progenitores.

Sección Strombocarpa

Todos los individuos de las dos especies analizadas P.strombulifera y P.reptans, mostraron el mismo patrón de 3 bandas de migración anódica las cuales fueron denominadas ADH-6, ADH-6-7 y ADH-7, siendo la última banda la de menor velocidad de migración y la ADH-6-7 de velocidad intermedia entre/

ADH-6 y ADH-7. Esta banda de velocidad intermedia mostró una intensidad de coloración mayor que la de las otras dos (Fig. 4 A, muestras 1-5; B, fenotipo 3).

La banda de mayor velocidad de migración (ADH-6) tiene movilidad intermedia entre las bandas ADH-1 y ADH-2, descritas en algunas especies de la sección Algarobia y ADH-7 presenta una velocidad de migración menor que la banda ADH-3, común a todas las especies estudiadas en la sección anterior (Fig. 4A, muestras 1-5; B, fenotipo 3).

#### Determinación de los probables loci y alelos.

##### Sección Algarobia

En base a los resultados presentados se postuló que esta enzima en estas especies sería dimérica como en trigo (Hart, 1970), Clarkia franciscana (Gottlieb, 1974 b), maíz (Schwartz, 1975) y otras especies.

El patrón de 3 bandas observado en P.ruscifolia y P.nigra se explicaría considerando que la enzima estaría codificada por dos loci monomórficos que fueron denominados Adh-1 y Adh-2. Las bandas ADH-1 y ADH-3 respectivamente serían los homodímeros producidos por cada uno de estos loci y la banda ADH-1-3 sería el heterodímero, producto de la interacción no alélica entre dicho genes. La situación sería similar en P.alba y P.hassleri, pero el locus Adh-1 presentaría un alelo diferente del fijado en P.ruscifolia y P.nigra. Por este motivo se denominó al alelo de P.ruscifolia y P.nigra / Adh-1<sup>1</sup> y al alelo de P.alba y P.hassleri, Adh-1<sup>2</sup>. La banda ADH-2 por lo tanto sería el homodímero correspondiente al gen Adh-1<sup>2</sup> mientras que ADH-2-3, sería el heterodímero formado por los productos de Adh-1<sup>2</sup> y Adh-2.

El estudio de semillas de árboles identificados como híbridos natura

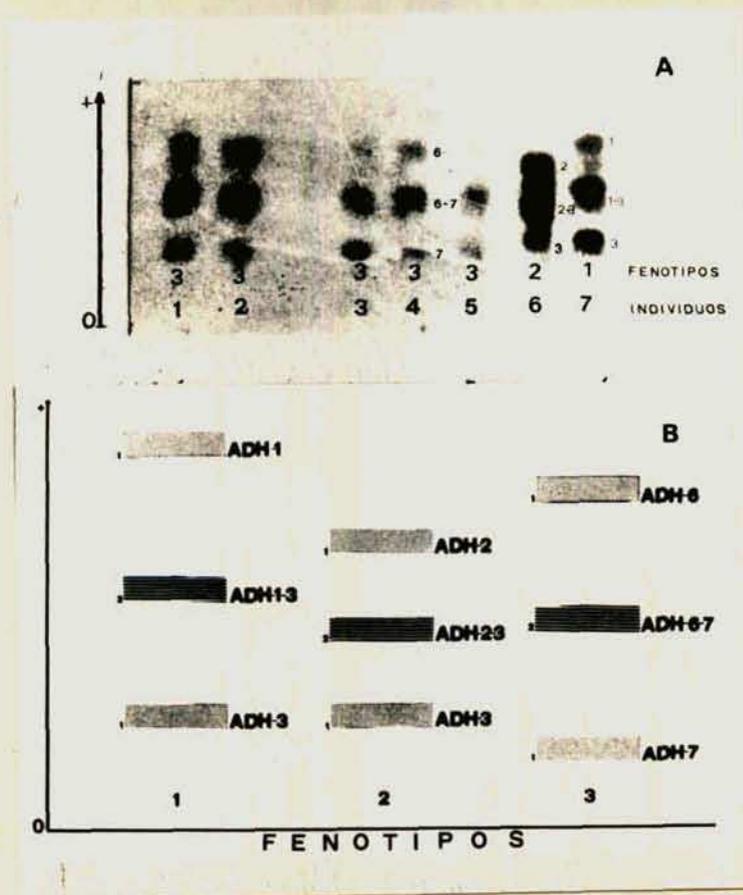


Figura 4. A) Zimograma de alcohol dehidrogenasa de individuos de especies de la Sección Strombocarpa. A): 1, 2 y 3, *P. strombulifera* (19, 19, 9563); 4 y 5, *P. reptans* (166). Individuos de referencia: 6, *P. alba* (315); 7, *P. ruscifolia* (710). Los números correspondientes a los fenotipos 1, 2 y 3 hacen referencia a los distintos patrones representados en B. B) Esquema representando el fenotipo de *P. reptans* y *P. strombulifera* (fenotipo 3) en relación con los encontrados en *P. alba* (fenotipo 2) y *P. ruscifolia* (fenotipo 1). Los números, a la izquierda de cada banda indican la relación de intensidad esperada para cada una de ellas.

les ha permitido confirmar ésta hipótesis. Como estas semillas son el producto de cruzamientos no controlados, ellas pueden ser el resultado de a) retrocruza con algunos de sus progenitores, b) cruzamiento con otro individuo de origen híbrido o c) cruzamiento con otro individuo de otra especie. Por lo tanto de un mismo árbol, se pueden obtener individuos que presentan características de un híbrido o patrones semejantes a los de los padres.

Los individuos de origen híbrido, de acuerdo a la hipótesis planteada podrían presentar en el caso de P.ruscifolia x P.alba o P.hassleri, hasta 6 bandas. Estas se obtendrían en una semilla que fuera heterocigota para el locus Adh-1, como resultado de la interacción alélica entre Adh-1<sup>1</sup> y // Adh-1<sup>2</sup> (formando un grupo de 3 bandas: ADH-1, ADH-1-2 y ADH-2) e interacción no alélica entre Adh-1<sup>1</sup> y Adh-1<sup>2</sup> con Adh-2, respectivamente (formando otro grupo de 2 bandas: ADH-1-3 y ADH-2-3) y finalmente la banda ADH-3 monomórfica común a las tres especies. Esto fue efectivamente observado en semillas de presuntos híbridos.

La mayoría de los individuos de P.nigra y P.ruscifolia, así como todos los de P.alba y P.hassleri mostraron una intensidad de coloración de / sus bandas aproximadamente igual a la esperada para una enzima dimerica: // 1/4 (ADH-1): 1/2 (ADH-1-3): 1/4 (ADH-3) y 1/4 (ADH-2): 1/2 (ADH-2-3): 1/4 / (ADH-3) respectivamente (Fig. 2A, muestras 13, 14, 15). Si la síntesis polipeptídica, asociación y expresión isoenzimática fueran equivalentes para los productos de estos genes la intensidad relativa esperada para las 6 bandas producidas en los individuos de origen híbrido P.ruscifolia x P.alba, / P.ruscifolia x P.hassleri y P.nigra x P.hassleri sería de 1/16 (ADH-1): 2/16 (ADH-1-2): 1/16 (ADH-2): 4/16 (ADH-1-3): 4/16 (ADH-2-3): 4/16 (ADH-3) (Fig. 3, fenotipo 4) y por lo tanto se podría suponer que la regulación de las // Isoenzimas sería la misma en las distintas especies que produjeron el individuo híbrido y que sus subunidades polipeptídicas tienen la misma afinidad

(Gottlieb, 1974 b). Sin embargo algunos individuos de P.ruscifolia y P.nigra mostraron una intensidad de su banda ADH-1 menor que la esperada // (Fig. 2 A muestras 1 y 2; D muestra 4) hecho que se mantiene en algunos individuos de origen híbrido, donde probablemente ellos hayan actuado como uno de los progenitores (Fig. 2 A, muestras 4,5 y 6). Esta variación cuantitativa del producto del alelo Adh-1<sup>1</sup>, podría ser causada por los siguientes fenómenos: i) cambios en la secuencia de aminoácidos en las cadenas polipeptídicas que no producen cambios en las movilidades electroforéticas de las moléculas pero causan alteraciones en sus actividades específicas; ii) diferentes cantidades de moléculas enzimáticas con la misma estructura; iii) Producción de enzimas en la misma cantidad y con igual actividad catalítica pero factores diferentes en el medio celular de los individuos causan una actividad diferencial de las enzimas. Discriminar entre éstas posibilidades / va mas allá del alcance de este trabajo, sin embargo esta actividad diferencial debida a cualquiera de los factores descritos sugieren una divergencia entre el alelo fijado en P.nigra y P.ruscifolia (Adh-1<sup>1</sup>) con respecto / al fijado en P.alba y P.hassleri (Adh-1<sup>2</sup>) para el cual no se observó tal variación cuantitativa. .

Los patrones observados en P.vinalillo sugerirían que esta especie sería polimórfica para Adh-1, presentando los alelos Adh-1<sup>1</sup> y Adh-1<sup>2</sup>, pues / se encontraron individuos con patrones semejantes a P.alba o P.hassleri, // P.nigra o P.ruscifolia y a los híbridos entre estas especies.

La presencia de bandas ADH-3-4 y ADH-4 en algunos individuos sugieren la existencia de un nuevo alelo para el locus Adh-2, que se denominaría Adh-2<sup>4</sup>, siendo Adh-2<sup>3</sup> el alelo encontrado en las especies ya descritas. Este nuevo alelo indicaría la presencia de un polimorfismo incipiente en // P.vinalillo o quizás provenga de la hibridación con alguna otra especie no estudiada en este trabajo.

Algunos individuos de P.vinalillo que presentaron el fenotipo ADH-1 ADH-1-3 y ADH-3, mostraron (al igual que algunos individuos de P.ruscifolia y P.nigra) la banda ADH-1 más tenue que lo esperado para una enzima dimerica ( $1/4 : 1/2 : 1/4$ ) y es así que algunos de los individuos con 6 bandas (figura 3, fenotipo 4) mantuvieron esta banda con menor intensidad de coloración que lo esperado (Fig. 2 A, muestras 7-9). Este hecho podría indicar // que P.vinalillo es una especie proveniente de la hibridación de P.ruscifolia o P.nigra con P.alba o P.hassleri. Sin embargo, P.vinalillo mostró características no halladas en las posibles especies parentales. Ellas fueron la aparición de algunos individuos donde la banda ADH-3 (Fig. 2 A, muestra/ 10) y la banda ADH-4 (Fig. 2 C ) estaban menos teñidas que lo esperado. Es to indicaría un comienzo de divergencia para ADH de esta especie con res// pecto a aquéllas que pudieron haberla originado. La hipótesis presentada para explicar los patrones isoenzimáticos descritos en P.alba, P.ruscifolia, P.nigra y P.hassleri, pueden adaptarse para aquéllos encontrados en P.calde nia, P.flexuosa y P.alpataco considerando que éstas son polimórficas para / Adh-1, presentando este locus 3 alelos: Adh-1<sup>1</sup>, Adh-1<sup>2</sup>, y Adh-1<sup>23</sup>. De esta / suposición surgen los 6 fenotipos antes descritos, producidos: a) por inter acción alélica entre Adh-1<sup>1</sup> y Adh-1<sup>2</sup> (Banda ADH-1-2); Adh-1<sup>1</sup> y Adh-1<sup>23</sup> (Ban da ADH-1-23) y Adh-1<sup>2</sup> y Adh-1<sup>23</sup> (Banda ADH-2-23) y b) por interacciones no/ alélicas entre Adh-1<sup>1</sup>, Adh-1<sup>2</sup> y Adh-1<sup>23</sup> con Adh-2, formando respectivamente las bandas ADH-1-3, ADH-2-3 y ADH-23-3.

Las intensidades de las bandas en los zimogramas de algunos indivi- duos de estas tres especies no cumplen con las relaciones de intensidad es- peradas descritas anteriormente (Fig. 3, fenotipos 1,2,3,4,5,6). Las causas/ pueden ser las mismas que las supuestas para P.nigra y P.ruscifolia. Ya que diferencias regulatorias dentro de una especie de fecundación cruzada de berían producir barreras reproductivas (Stebbins, 1958; Ohno, 1970; Cordel-

ro, 1974), no sería de esperar que las variaciones de intensidades observadas se debieran a problemas regulatorios.

Los patrones de 3 y 6 bandas provenientes de semillas de origen híbrido entre estas entidades mostraron, al igual que aquéllas provenientes / de árboles sin indicio de hibridación, una intensidad de coloración que se apartaba de lo esperado. En estas especies no se observó un patrón diferencial típico que permita distinguir las entre sí.

En base a la hipótesis de un gen con tres alelos para Adh-1, se calcularon las frecuencias alélicas en las especies que mostraron polimorfismo para este locus (P.caldenia, P.alpataco y P.flexuosa) (Tabla 119) para ver si las frecuencias genotípicas se ajustaban a las esperadas para las condiciones de la ley de Hardy-Weinberg (Tablas 2, 3, y 4). Los resultados de la prueba de  $\chi^2$  indicaron que las frecuencias observadas en estas tres especies se ajustaban a los valores esperados ( $p > 0.05$ ). No se calcularon las // frecuencias alélicas en P.vinalillo, debido a que se contó con pocos individuos.

### Sección Strombocarpa

Dado que no se contó con individuos de origen híbrido entre estas // especies, se supuso por analogía con lo observado en las especies de la Sección Algarobia, que las bandas ADH-6, ADH-6-7 y ADH-7 corresponderían a enzimas diméricas, productos de dos loci monomórficos (Adh-6 y Adh-7) que podrían interactuar.

Para poder probar esta hipótesis se aplicó un método indirecto. Como se explicó anteriormente las 3 bandas se visualizan perfectamente en semillas 24 hs. después de la germinación y a medida que la planta crece las

Tabla 2. Comparación de las frecuencias genotípicas absolutas observadas y esperadas para el locus Adh-1 en P. flexuosa (Cura-Có).

Genotipos Postulados	N° Observados	N° Esperados
Adh-1 <sup>1/1</sup>	39	40.96
Adh-1 <sup>2/2</sup>	5	6.25
Adh-1 <sup>23/23</sup>	3	1.21
Adh-1 <sup>1/2</sup>	37	32.00
Adh-1 <sup>2/23</sup>	3	5.50
Adh-1 <sup>1/23</sup>	13	14.08

$$\chi^2_3 = 4.99; p = 0.17$$

Tabla 3. Comparación de las frecuencias genotípicas absolutas observadas y esperadas para el locus Adh-1 en P. caldenia (Santa Rosa).

Genotipos Postulados	N° Observados	N° Esperados
Adh-1 <sup>1/1</sup>	31	29.96
Adh-1 <sup>2/2</sup>	7	5.53
Adh-1 <sup>23/23</sup>	0	0.23
Adh-1 <sup>1/2</sup>	23	25.74
Adh-1 <sup>2/23</sup>	2	2.27
Adh-1 <sup>1/23</sup>	6	5.27

5.47

$$\chi^2_2 = 0.80; p = 0.67$$

Tabla 4. Comparación de las frecuencias genotípicas absolutas observadas y esperadas para el locus Adh-1 en P. alpataco (Chacharramendi).

Genotipos Postulados	N° Observados	N° Esperados	
Adh-1 <sup>1/1</sup>	47	45.59	
Adh-1 <sup>2/2</sup>	2	1.02	
Adh-1 <sup>23/23</sup>	2	0.36	] 1.58
Adh-1 <sup>1/2</sup>	13	13.67	
Adh-1 <sup>2/23</sup>	0	1.22	
Adh-1 <sup>1/23</sup>	6	8.14	

$$\chi^2_2 = 1.69; p = 0.43$$

bandas tienden a desaparecer. Si las bandas estuviesen codificadas por alelos de un gen es de esperar que ellas se comporten de la misma manera a lo largo del desarrollo. Sin embargo, en este caso la banda ADH-7 tiende a desaparecer antes que la ADH-6. Esto confirmaría la hipótesis de que las dos bandas corresponderían a loci diferentes, y que la banda ADH-6-7 sería el / producto de la interacción no alélica entre los loci Adh-6 y Adh-7.

GLUTAMATO OXALACETATO TRANSAMINASA E.C. 2.6.1.1. (GOT)

Selección de los órganos analizados

Para la elección de los tejidos a utilizar en el análisis se probaron los mismo órganos y períodos del desarrollo que para el alcohol dehidrogenasa. En todos ellos se obtuvo el mismo patrón de bandas pero en epicótilo e hipocótilo la coloración fue más tenue. Finalmente se escogió el estadio/ de semillas 24 hs. después de la iniciación de la germinación a fin de acortar al mínimo posible el tiempo desde la siembra hasta la utilización del / material.

Sección Algarobía

1) P.ruscifolia, P.alba, P.hassleri, P.nigra, P.flexuosa, P.alpataco, P.caldenia y P.vinalillo.

En todas las especies analizadas de esta Sección se pueden diferenciar 3 zonas con actividad GOT. Estas fueron numeradas en orden decreciente de velocidad anódica GOT I, GOT II y GOT III (Fig. 5). Cada individuo / presentó en cada zona una banda como mínimo y 3 como máximo, observándose / sólo 3 combinaciones diferentes en cada región, a excepción de P.ruscifolia del Dpto. de Avellaneda que mostró 6 combinaciones diferentes en la región / GOT II.

En cada una de las regiones, cuando se presentaron las 3 bandas, la // del medio se teñía con mayor intensidad que las otras dos. El último grupo/ de bandas (GOT III) se teñía muy tenuemente y en ciertos individuos resultaba difícil su identificación.

Además de estas bandas existía otra que se ubicaba inmediatamente / por debajo del primer grupo (GOT I). Como no presentaba un patrón constante no fue incluida en el análisis (Fig. 5 B, banda que aparece por debajo de / la I-2, en las muestras 1,2,3,5,6,7,8,9 ).

Las bandas fueron numeradas en orden decreciente de velocidad anó- / dica. En la zona GOT I, P.alba, P.hassleri, P.ruscifolia, P.caldenia y P.vi- / nalillo presentaron las siguientes bandas: GOT I-1, GOT I-1-2 y GOT I-2 // (Fig. 5 B, muestras 1,2,3,5,7,8,9,10,11; D, muestra 6; E). En P.flexuosa, / P.alpataco y P.nigra se encontraron las bandas GOT I-2, GOT I-2-3 y GOT I- / 3 (Fig. 5 A, muestras 1-7; C). La banda GOT I-2 tiene aproximadamente la // misma velocidad de migración que la GOT I-1-3 por esa razón en la fig. 5 E / están dibujadas como una única banda (GOT I-2-GOT I-1-3).

En la zona GOT II se observan en las especies P.flexuosa, P.alba, P.vi- / nalillo, P.alpataco, P.nigra, P.hassleri y P.ruscifolia (Poblaciones de Co- / po y Formosa) las siguientes bandas: GOT II-1, GOT II-1-2 y GOT II-2 (Fig. / 5 A, B, C).

En P.caldenia se encuentran presentes las bandas GOT II-2, GOT II-2 / -3 y GOT II-3 (Fig. 5 D, muestras 1 y 3) y en P.ruscifolia del Dpto. de Ave / llaneda, GOT II-1, GOT II-1-2, GOT II-2, GOT II-1-3, GOT II-2-3- y GOT II-3. Las bandas GOT II-2 y GOT II-1-3- presentan una velocidad de migración muy similar, de modo que el esquema (Fig. 5 E) se superponen.

La mayoría de las especies analizadas presentaron en GOT III las si / guientes bandas: GOT III-1, GOT III-1-2 y GOT III-2 (Fig. 5 A, B, C, D, y / E.) P.ruscifolia de la Pcia. de Formosa, P.caldenia y P.vinalillo sólo mos / traron la banda GOT III-1. Las bandas GOT II-3 y GOT III-1 tienen aproxima / damente la misma velocidad de migración, razón por la cual en la figura 5 // E están dibujadas como una única banda (GOT II-3- GOT III-1).

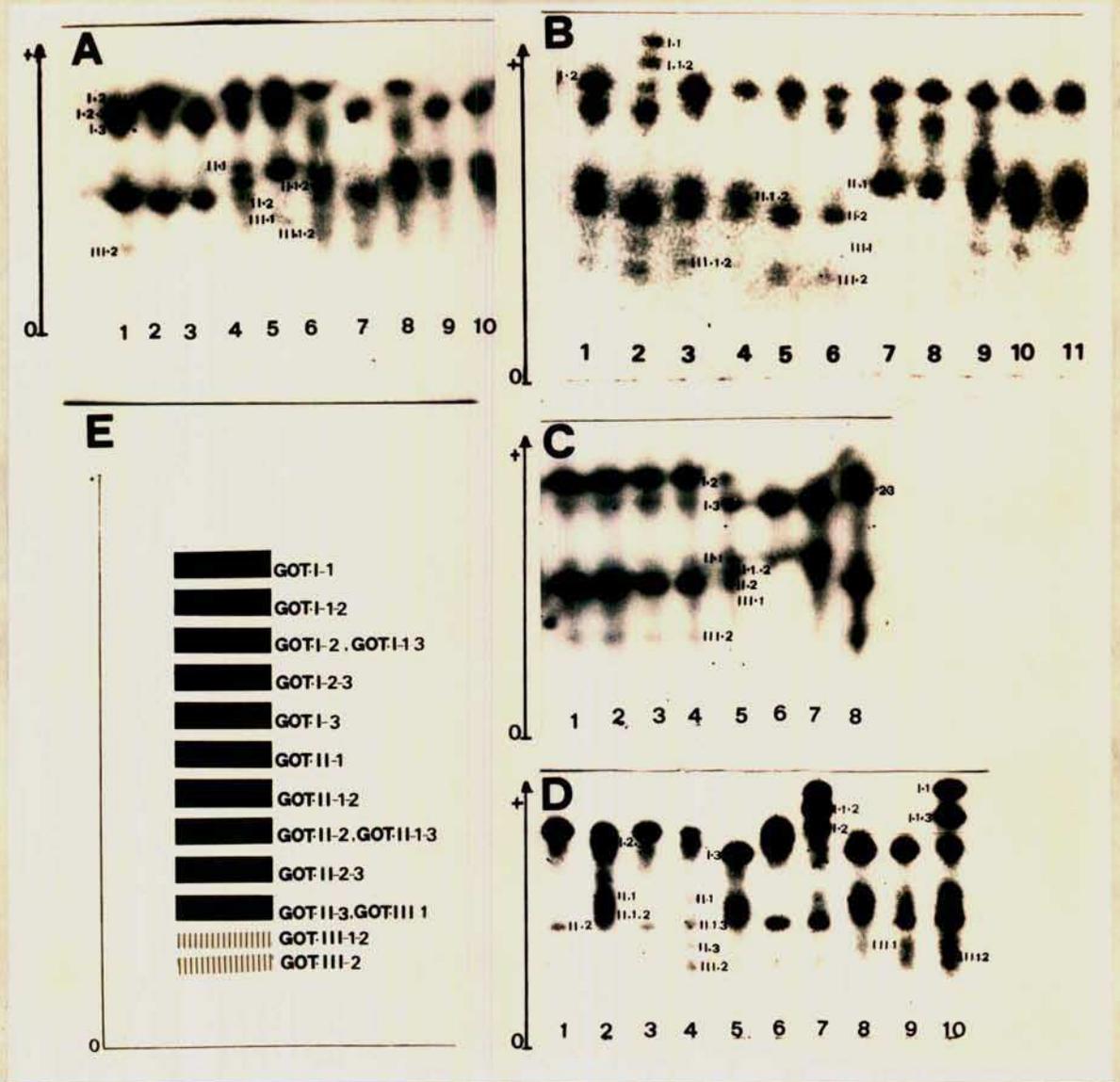


Figura 5. A, B, C, y D) Zimogramas de glutamato oxalacetato transaminasa de individuos de especies de la Sección Algarobia. A): 1-3, *P. alpataco* (102, 108, 109); 4-7, *P. flexuosa* (127, 128, 129, 131); 8-10, *P. flexuosa* x *P. alpataco* (110, 113, 114). B): 1 y 3, *P. alba* (489, 329); 7, 8 y 9 *P. ruscifolia* (571, 572, 573); 2 y 5, *P. hassleri* (327, 316); 4, *P. ruscifolia* x *P. hassleri* (479); 6, *P. alba* x *P. hassleri* (469); 10 y 11, *P. vinalillo* (497, 500). C): 1-8, *P. nigra* (139, 140, 142, 358, 359, 431, 432). D): 6, *P. caldenia* (119). Semillas provenientes de árboles muy próximos entre sí determinados como *P. caldenia*: 1 y 3 (104, 115); *P. flexuosa*: 2, 4, 8, 9 y 10 (100, 103, 105, 106, 107); *P. alpataco*: 5 y 7 (171, 172). En los zimogramas A, B, C y D. se indican los números de las bandas siguiendo la nomenclatura esquematizada en E. E) Esquema de las bandas observadas en los individuos analizados.

II) P.ruscifolia x P.alba?, P.ruscifolia x P.hassleri, P.alba x P.hassleri y P.alpataco x P.flexuosa.

Sólo se observaron individuos con las bandas características descriptas para los posibles progenitores (Fig. 5 A, muestras 8-10; B, muestras 4 y 6).

III) P.alba x P.flexuosa y P.nigra x P.hassleri.

De cada uno de estos híbridos sólo se estudiaron individuos provenientes de un único árbol. La banda encontrada en la región GOT I fue GOT I-2, en la zona GOT II, la banda GOT II-2 y en la región GOT III, las bandas GOT III-1, GOT III-1-2 y GOT III-2.

IV) P.caldenia, P.flexuosa y P.alpataco, provenientes de un enjambre híbrido.

Cuando se analizaron las semillas de P.alpataco (171, 172) y P.flexuosa (100, 103, 105, 106, 107) se encontraron 6 combinaciones diferentes de bandas tanto para la región GOT I como para la GOT II. Tres de ellas eran nuevas, no observadas para estas dos especies en las localidades sin indicios de hibridación. El resto de tales combinaciones eran similares a las ya descritas para ellas y coincidían con los patrones esperados para la especie a la cual pertenecía la planta madre. En la región GOT I las bandas encontradas fueron las siguientes: GOT I-1, GOT I-2, GOT I-3, GOT I-1-2, GOT I-1-3, y GOT I-2-3. En GOT II por su parte, se observaron las bandas: GOT II-1, GOT II-2, GOT II-3, GOT II-1-2, GOT II-1-3 y GOT II-2-3.

Finalmente, para la región GOT III los patrones encontrados en las/

muestras provenientes de enjambres híbridos no difirieron de aquellos ya descritos para muestras provenientes de zonas en donde las especies estaban // aisladas y que por lo tanto no se esperaba que hubiera ocurrido hibridación / (Fig. 5 D, muestras 2, 4, 5, 7, 8, 9, y 10).

Las plantas de P.caldenia (104, 115, 116, 117) se encontraban muy próximas en el campo a las de P.alpataco y P.flexuosa, sin embargo sus semillas/ sólo mostraron patrones correspondientes a los de muestras de la especie de / regiones en la cual se encuentra aislada (Fig. 5 D, muestras 1 y 3).

#### Determinación de los probables loci y alelos.

En base a estos resultados podría postularse que cada zona estaría codicada por un gen con 2 o 3 alelos, los cuales producirían enzimas con es-/ tructura dimérica. La banda híbrida que se forma en cada zona sería el resul- tado de la asociación al azar de los diferentes monómeros producidos por cada uno de los alelos que se encuentran en los individuos heterocigotas.

La observación de los patrones isoenzimáticos de los posibles híbridos y/o introgresantes haría suponer la existencia de los mismo loci en estas es- pecies con los mismos o diferentes alelos presentes en cada una de ellas.

Para la zona GOT I existiría un gen que se denominó Got-1 con tres ale los codominantes llamados Got-1<sup>1</sup>, Got-1<sup>2</sup> y Got-1<sup>3</sup> de acuerdo al orden decre- ciente de velocidad de migración de los correspondientes homodímeros. El ale- lo Got-1<sup>2</sup> es común a todas las especies analizadas de esta Sección, mientras/ que el alelo Got-1<sup>1</sup> está presente en P.alba, P.hassleri, P.ruscifolia, P.cal- denia y P.vinalillo y el alelo Got-1<sup>3</sup> en P.flexuosa, P.alpataco y P.nigra.

Codificando para la zona GOT II también existiría un gen con tres ale los codominantes. A este locus se lo denominó Got-2 y a sus alelos Got-2<sup>1</sup>, Got-2<sup>2</sup> y Got-2<sup>3</sup>. El alelo Got-2<sup>2</sup> se encuentra presente en todas las especies y poblaciones aquí estudiadas de esta Sección, Got-2<sup>1</sup> se halla ausente en P.calde-

nia y Got-2<sup>3</sup> sólo se encuentra en P. caldenia y P. ruscifolia del Dpto de Avellaneda. En esta última población, por lo tanto, se encuentran los tres alelos y se pueden así observar las seis combinaciones de bandas antes descriptas.

Con respecto a la zona GOT III existiría otro gen al que se llamó Got-3 con dos alelos codominantes, Got-3<sup>1</sup> y Got-3<sup>2</sup>, siendo 1, el alelo que codifica la banda más veloz y 2 la más lenta. Ambos alelos están presentes en P. nigra, P. alba, P. hassleri, P. flexuosa, P. alpataco, y P. ruscifolia de los Dptos. de Avellaneda y Copo, mientras que en P. ruscifolia de Formosa, // P. caldenia y P. vinalillo sólo se halla presente en el alelo Got-3<sup>1</sup>.

En base a esta hipótesis, los diferentes fenotipos observados responderían a los diferentes genotipos de acuerdo a la siguiente tabla:

ZONA	GENOTIPOS PROPUESTOS	BANDAS
GOT I	Got-1 <sup>1/1</sup>	GOT I-1
	Got-1 <sup>2/2</sup>	GOT I-2
	Got-1 <sup>3/3</sup>	GOT I-3
	Got-1 <sup>1/2</sup>	GOT I-1, GOT I-1-2, GOT I-2
	Got-1 <sup>1/3</sup>	GOT I-1, GOT I-1-3, GOT I-3
	Got-1 <sup>2/3</sup>	GOT I-2, GOT I-2-3, GOT I-3
GOT II	Got-2 <sup>1/1</sup>	GOT II-1
	Got-2 <sup>2/2</sup>	GOT II-2
	Got-2 <sup>3/3</sup>	GOT II-3
	Got-2 <sup>1/2</sup>	GOT II-1, GOT II-1-2, GOT II-2
	Got-2 <sup>1/3</sup>	GOT II-1, GOT II-1-3, GOT II-3
	Got-2 <sup>2/3</sup>	GOT II-2, GOT II-2-3, GOT II-3

ZONA	GENOTIPOS PROPUESTOS	BANDAS
GOT III	Got-3 <sup>1/1</sup>	GOT III-1
	Got-3 <sup>1/2</sup>	GOT III-1, GOT III-1-2, GOT III-2
	Got-3 <sup>2/2</sup>	GOT III-2

A excepción del locus GOT III en P.caldenia y P.ruscifolia de Formosa, las especies fueron polimórficas para GOT I, GOT II y GOT III para un criterio del 1 %.

En base a las frecuencias alélicas (Tabla 119) se calcularon las // frecuencias esperadas para el equilibrio de Hardy-Weinberg y, cuando se pudo, por medio de una prueba de  $\chi^2$  se comprobó estadísticamente si las frecuencias observadas se apartaban significativamente de las esperadas (Tablas 5 a 32).

En todos los casos analizados, las frecuencias observadas no se // apartaban significativamente de las esperadas ( $p > 0.05$ ). Dado que las semillas analizadas de P.vinalillo provienen solamente de tres árboles madres, las frecuencias alélicas no fueron calculadas por considerarse la muestra / demasiado pequeña.

Para las poblaciones de Avellaneda, Copo y Formosa de P.ruscifolia, // se realizaron tablas de contingencia (Tablas 33 a 35) para determinar si difieren con respecto a las frecuencias genotípicas de cada locus. Las poblaciones de Copo y Formosa para el locus Got-1 no difirieron significativamente ( $p > 0.05$ ). Las restantes comparaciones dieron diferencias altamente significativas ( $p < 0.01$ ).

Tabla 5. Frecuencias genotípicas absolutas observadas y esperadas para el locus Got-1 en P. ruscifolia (Copo).

Genotipos Postulados	N° Observados	N° Esperados
Got-1 <sup>1/1</sup>	0	0.25
Got-1 <sup>1/2</sup>	8	7.56
Got-1 <sup>2/2</sup>	56	56.19

Tabla 6. Comparación de las frecuencias genotípicas absolutas observadas y esperadas para el locus Got-2 en P. ruscifolia (Copo).

Genotipos Postulados	N° Observados	N° Esperados
Got-2 <sup>1/1</sup>	48	46.27
Got-2 <sup>1/2</sup>	12	15.44
Got-2 <sup>2/2</sup>	3	1.29

$\chi^2_1 = 3.14; p = 0.08$

Tabla 7. Frecuencias genotípicas absolutas observadas y esperadas para el locus Got-3 en P. ruscifolia (Copo).

Genotipos Postulados	N° Observados	N° Esperados
Got-3 <sup>1/1</sup>	54	54.63
Got-3 <sup>1/2</sup>	13	11.74
Got-3 <sup>2/2</sup>	0	0.63

Tabla 8. Comparación de las frecuencias genotípicas absolutas observadas y esperadas para el locus Got-1 en P. ruscifolia (Avellaneda).

Genotipos Postulados	N° Observados	N° Esperados
Got-1 <sup>1/1</sup>	4	3.42
Got-1 <sup>1/2</sup>	29	30.16
Got-1 <sup>2/2</sup>	67	66.42

$\chi^2_1 = 0.147$ ;  $p = 0.70$

Tabla 9. Comparación de las frecuencias genotípicas absolutas observadas y esperadas para el locus Got-2 en P. ruscifolia (Avellaneda).

Genotipos Postulados	N° Observados	N° Esperados
Got-2 <sup>1/1</sup>	0	0.49
Got-2 <sup>1/2</sup>	7	10.71
Got-2 <sup>1/3</sup>	7	2.31
Got-2 <sup>2/2</sup>	60	58.52
Got-2 <sup>2/3</sup>	26	25.25
Got-2 <sup>3/3</sup>	0	2.72

$\chi^2_1 = 1.75$ ;  $p = 0.19$

5.52

Tabla 10. Comparación de las frecuencias genotípicas absolutas observadas y esperadas para el locus Got-3 en P. ruscifolia (Avellaneda).

Genotipos Postulados	N° Observados	N° Esperados
Got-3 <sup>1/1</sup>	83	82.81
Got-3 <sup>1/2</sup>	16	16.38
Got-3 <sup>2/2</sup>	1	0.81

$\chi^2_1 = 0.058$ ;  $p = 0.81$

Tabla 11. Comparación de las frecuencias genotípicas absolutas observadas y esperadas para el locus Got-1 en P. ruscifolia (Formosa).

Genotipos Postulados	N° Observados	N° Esperados
Got-1 <sup>1/1</sup>	1	0.32
Got-1 <sup>1/2</sup>	6	7.36
Got-1 <sup>2/2</sup>	43	42.32

$\chi^2_1 = 1.71$ ;  $p = 0.19$

Tabla 12. Frecuencias genotípicas absolutas observadas y esperadas para el locus Got-2 en P. ruscifolia (Formosa).

Genotipos Postulados	N° Observados	N° Esperados
Got-2 <sup>1/1</sup>	40	43.14
Got-2 <sup>1/2</sup>	30	23.62
Got-2 <sup>2/2</sup>	0	3.24

Tabla 13. Comparación de las frecuencias genotípicas absolutas observadas y esperadas para el locus Got-1 en P. nigra (Entre Ríos).

Genotipos Postulados	N° Observados	N° Esperados
Got-1 <sup>2/2</sup>	37	35.36
Got-1 <sup>2/3</sup>	27	30.18
Got-1 <sup>3/3</sup>	8	6.44

$\chi^2_1 = 0.79$ ;  $p = 0.37$

Tabla 14. Comparación de las frecuencias genotípicas absolutas observadas y esperadas para el locus Got-2 en P. nigra (Entre Ríos).

Genotipos Postulados	N° Observados	N° Esperados
Got-2 <sup>1/1</sup>	25	26.88
Got-2 <sup>1/2</sup>	38	34.22
Got-2 <sup>2/2</sup>	9	10.90

$\chi^2_1 = 0.87; p = 0.35$

Tabla 15. Comparación de las frecuencias genotípicas absolutas observadas y esperadas para el locus Got-3 en P. nigra (Entre Ríos).

Genotipos Postulados	N° Observados	N° Esperados
Got-3 <sup>1/1</sup>	9	7.90
Got-3 <sup>1/2</sup>	29	31.24
Got-3 <sup>2/2</sup>	32	30.86

$\chi^2_1 = 0.36; p = 0.55$

Tabla 16. Comparación de las frecuencias genotípicas absolutas observadas y esperadas para el locus Got-1 en P. nigra (Sgo. del Estero).

Genotipos Postulados	N° Observados	N° Esperados
Got-1 <sup>2/2</sup>	11	12.41
Got-1 <sup>2/3</sup>	37	34.13
Got-1 <sup>3/3</sup>	22	23.46

$\chi^2_1 = 0.49; p = 0.48$

Tabla 17. Comparación de las frecuencias genotípicas absolutas observadas y esperadas para el locus Got-2 en P. nigra (Sgo. del Estero).

Genotipos Postulados	N° Observados	N° Esperados
Got-2 <sup>1/1</sup>	4	4.12
Got-2 <sup>1/2</sup>	26	25.72
Got-2 <sup>2/2</sup>	40	40.16

$\chi^2_1 = 0.007$ ;  $p = 0.93$

Tabla 18. Comparación de las frecuencias genotípicas absolutas observadas y esperadas para el locus Got-3 en P. nigra (Sgo. del Estero).

Genotipos Postulados	N° Observados	N° Esperados
Got-3 <sup>1/1</sup>	38	38.38
Got-3 <sup>1/2</sup>	29	26.25
Got-3 <sup>2/2</sup>	3	4.37

$\chi^2_1 = 0.721$ ;  $p = 0.40$

Tabla 19. Frecuencias genotípicas absolutas observadas y esperadas para el locus Got-1 en P. alba (Formosa).

Genotipos Postulados	N° Observados	N° Esperados
Got-1 <sup>1/1</sup>	0	0.03
Got-1 <sup>1/2</sup>	3	3.01
Got-1 <sup>2/2</sup>	67	66.96

Tabla 20. Comparación de las frecuencias genotípicas absolutas observadas y esperadas para el locus Got-2 en P. alba (Formosa).

Genotipos Postulados	N° Observados	N° Esperados
Got-2 <sup>1/1</sup>	4	2,10
Got-2 <sup>1/2</sup>	11	14,80
Got-2 <sup>2/2</sup>	28	26,10

$\chi^2_1 = 2.83; p = 0.09$

Tabla 21. Comparación de las frecuencias genotípicas absolutas observadas y esperadas para el locus Got-3 en P. alba (Formosa).

Genotipos Postulados	N° Observados	N° Esperados
Got-3 <sup>1/1</sup>	4	1,92
Got-3 <sup>1/2</sup>	12	16,13
Got-3 <sup>2/2</sup>	36	33,95

$\chi^2_1 = 3.41; p = 0.06$

Tabla 22. Frecuencias genotípicas absolutas observadas y esperadas para el locus Got-1 P. hassleri (Formosa).

Genotipos Postulados	N° Observados	N° Esperados
Got-1 <sup>1/1</sup>	0	0,17
Got-1 <sup>1/2</sup>	6	5,71
Got-1 <sup>2/2</sup>	49	49,12

Tabla 23. Comparación de las frecuencias genotípicas absolutas observadas y esperadas para el locus Got-2 en P. hassleri (Formosa).

Genotipos Postulados	N° Observados	N° Esperados
Got-2 <sup>1/1</sup>	3	3.40
Got-2 <sup>1/2</sup>	24	23.16
Got-2 <sup>2/2</sup>	39	39.44

---

$\chi^2_1 = 0.086; p = 0.77$

Tabla 24. Comparación de las frecuencias genotípicas absolutas observadas y esperadas para el locus Got-3 en P. hassleri (Formosa).

Genotipos Postulados	N° Observados	N° Esperados
Got-3 <sup>1/1</sup>	4	1.92
Got-3 <sup>1/2</sup>	12	16.13
Got-3 <sup>2/2</sup>	36	33.95

---

$\chi^2_1 = 3.41; p = 0.06$

Tabla 25. Comparación de las frecuencias genotípicas absolutas observadas y esperadas para el locus Got-1 en P. alpataco (Chacharramendi).

Genotipos Postulados	N° Observados	N° Esperados
Got-1 <sup>2/2</sup>	25	26.07
Got-1 <sup>2/3</sup>	23	20.79
Got-1 <sup>3/3</sup>	3	4.14

---

$\chi^2_1 = 0.59; p = 0.44$

Tabla 26. Comparación de las frecuencias genotípicas absolutas observadas y esperadas para el locus Got-2 en P. alpataco (Chacharramendi).

Genotipos Postulados	N° Observados	N° Esperados
Got-2 <sup>1/1</sup>	1	0.73
Got-2 <sup>1/2</sup>	11	11.75
Got-2 <sup>2/2</sup>	48	47.52

$\chi^2_1 = 0.15; p = 0.70$

Tabla 27. Comparación de las frecuencias genotípicas absolutas observadas y esperadas para el locus Got-3 en P. alpataco (Chacharramendi).

Genotipos Postulados	N° Observados	N° Esperados
Got-3 <sup>1/1</sup>	13	10.84
Got-3 <sup>1/2</sup>	25	29.32
Got-3 <sup>2/2</sup>	22	19.84

$\chi^2_1 = 1.3; p = 0.25$

Tabla 28. Comparación de las frecuencias genotípicas absolutas observadas y esperadas para el locus Got-1 en P. flexuosa (Cuña-Có).

Genotipos Postulados	N° Observados	N° Esperados
Got-1 <sup>2/2</sup>		
Got-1 <sup>2/3</sup>	13	11.72
Got-1 <sup>3/3</sup>	27	29.60
Got-1	20	18.68

$\chi^2_1 = 0.46; p = 0.50$

Tabla 29. Comparación de las frecuencias genotípicas absolutas observadas y esperadas para el locus Got-2 en P. flexuosa (Cura-Có).

Genotipos Postulados	N° Observados	N° Esperados
Got-2 <sup>1/1</sup>	4	4.14
Got-2 <sup>1/2</sup>	21	20.79
Got-2 <sup>2/2</sup>	26	26.07

$\chi^2_1 = 0.007; p = 0.93$

Tabla 30. Comparación de las frecuencias genotípicas absolutas observadas y esperadas para el locus Got-3 en P. flexuosa (Cura-Có).

Genotipos Postulados	N° Observados	N° Esperados
Got-3 <sup>1/1</sup>	6	7.84
Got-3 <sup>1/2</sup>	28	24.31
Got-3 <sup>2/2</sup>	17	18.85

$\chi^2_1 = 1.17; p = 0.28$

Tabla 31. Frecuencias genotípicas absolutas observadas y esperadas para el locus Got-1 en P. caldenia (Santa Rosa).

Genotipos Postulados	N° Observados	N° Esperados
Got-1 <sup>1/1</sup>	0	0.11
Got-1 <sup>1/2</sup>	5	4.82
Got-1 <sup>2/2</sup>	55	55.07

Tabla 32. Frecuencias genotípicas absolutas observadas y esperadas para el locus Got-2 en P. caldenia (Santa Rosa).

<u>Genotipos</u> <u>Postulados</u>	<u>N°Observados</u>	<u>N°Esperados</u>
Got-2 <sup>1/1</sup>	56	56.10
Got-2 <sup>1/2</sup>	4	3.83
Got-2 <sup>2/2</sup>	0	0.07

Tabla 33. Tabla de contingencia para comparar las frecuencias genotípicas del locus Got-1 entre las diferentes poblaciones de P.ruscifolia.

A)

Poblaciones	Genotipos Propuestos		
	Got-1 <sup>1/1</sup>	Got-1 <sup>1/2</sup>	Got-1 <sup>2/2</sup>
Formosa	1	6	43
Copo	0	8	56
Avellaneda	4	29	67

$\chi^2_4 = 12.83; p = 0.01$

B)

Poblaciones	Genotipos Propuestos		
	Got-1 <sup>1/1</sup>	Got-1 <sup>1/2</sup>	Got-1 <sup>2/2</sup>
Formosa	1	6	43
Copo	0	8	56

$\chi^2_2 = 1.29; p = 0.52$

Tabla 34. Tabla de contingencia para comparar las frecuencias genotípicas del locus Got-2 entre las diferentes poblaciones de P.ruscifolia

Poblaciones	Genotipos Propuestos		
	Got-2 <sup>1/1</sup>	Got-2 <sup>1/2</sup>	Got-2 <sup>2/2</sup>
Formosa	40	30	0
Copo	48	12	3

$\chi^2_2 = 11.2; p = 0.004$

Tabla 35. Tabla de contingencia para comparar las frecuencias genotípicas del locus Got-3 entre las diferentes poblaciones de P.ruscifolia

Poblaciones	Genotipos Propuestos		
	Got-3 <sup>1/1</sup>	Got-3 <sup>1/2</sup>	Got-3 <sup>2/2</sup>
Formosa	37	27	8
Copo	54	13	0
Avellaneda	83	16	1

$$\chi^2_4 = 30.30; p \cong 0$$

### Sección Strombocarpa

Las especies de esta Sección mostraron seis zonas con actividad GOT/ a las que se denominó GOT A, GOT B, GOT C, GOT D, GOT E, y GOT F (Fig. 6)./ Estas no pueden homologarse en las zonas GOT I, GOT II y GOT III de la Sección Algarobia porque las velocidades de migración relativa de las bandas / son muy diferentes.

En ambas especies cada individuo presenta en GOT A y GOT B, una ban da como mínimo y tres como máximo, observándose sólo tres combinaciones di- ferentes en cada región. En cada zona, cuando se presentaron las tres ban- das, la del medio se teñía con mayor intensidad que las otras dos.

En cada una de las restantes cuatro zonas (GOT C a GOT F), solamen- te se observó una banda por zona, que no presentó ninguna variación entre / los individuos de ambas especies.

Las bandas de la zona GOT A fueron numeradas en orden decreciente / de velocidad de migración anódica como GOT A-1, GOT A-1-2, GOT A-2. Las ban das de la zona GOT B siguiendo el mismo criterio fueron denominadas GOT B -1, GOT B-1-2 y GOT B-2.

### Determinación de los probables loci y alelos.

No se contó con individuos de origen híbrido que permitieran análi- zar los probables loci y alelos. La determinación se basó principalmente en la observación de las bandas en geles al 5 % y 7%. Las bandas numeradas de igual forma en ambas especies variaban de la misma manera su movilidad al / cambiar el poro del gel. Esto apoyaría la hipótesis de que habría homología entre tales bandas y, por lo tanto, entre los genes que las codifican.

De acuerdo al patrón descripto, que es semejante al encontrado en /



Figura 6. A) Zimograma de glutamato oxalacetato transaminasa de individuos de especies de la Sección Strombocarpa.: 1 y 2, *P. strombulifera* (9563); 3-5, *P. strombulifera* (19); 6-8, *P. reptans* (166). En el zimograma A se indican los números de las bandas siguiendo la nomenclatura esquematizada en B. B) Esquema de las bandas observadas en los individuos analizados.

las diferentes zonas de la Sección anterior, es probable que las zonas GOT/ A y GOT B estén codificadas por un gen con dos alelos codominantes que producirían enzimas con estructura dimerica. La banda de velocidad intermedia/ que se forma en cada zona sería el resultado de la asociación al azar de // los monómeros diferentes codificados por cada uno de los alelos que se en-/ cuentran en los individuos heterocigotas. Se denominó Got-A al locus respon- sable de la formación de las bandas de la región Got-A y Got-A<sup>1</sup> y Got-A<sup>2</sup> / a sus alelos. En la zona GOT-B el gen fue denominado Got-B y sus alelos Got -B<sup>1</sup> y Got-B<sup>2</sup>. Para ambos genes los alelos fueron numerados de acuerdo al ór- den decreciente de velocidad de migración del homodímero correspondiente. / Las zonas GOT C a GOT F presentaron una banda monomórfica cada una. Se supo- ne que cada banda podría estar codificada por un gen distinto a los que se/ denominó respectivamente Got-C, Got-D, Got-E y Got-F y que por lo tanto es-/ tas dos especies no mostraron polimorfismo para los mismos.

En base a esta hipótesis, los diferentes fenotipos (bandas) observa- dos corresponderían a los diferentes genotipos de acuerdo a la siguiente ta- bla:

ZONAS	GENOTIPOS PROPUESTOS	BANDAS
	Got- A <sup>1/1</sup>	GOT A-1
GOT-A	Got- A <sup>1/2</sup>	GOT A-1, GOT A-1-2, GOT A-2
	Got- A <sup>2/2</sup>	GOT A-2,
	Got- B <sup>1/1</sup>	GOT B-1.
GOT-B	Got- B <sup>1/2</sup>	GOT B-1, GOT B-1-2, GOT B-2
	Got- B <sup>2/2</sup>	GOT B-2
GOT-C	Got- C	GOT C
GOT-D	Got- D	GOT D
GOT-E	Got- E	GOT E
GOT-F	Got- F	GOT F

Para GOT-A y GOT-B se procedió a calcular las frecuencias alélicas/ (Tabla 120) en base a las frecuencias fenotípicas observadas (Tablas 36 a / 41). En ambos casos las especies fueron polimórficas para un nivel del 1 %. En base a las frecuencias alélicas se calcularon las frecuencias genotípicas esperadas para el equilibrio de Hardy y Weinberg y por medio de una prueba/ de  $\chi^2$  se comprobó estadísticamente si las frecuencias observadas se apartaban significativamente de las del equilibrio (Tabla 36 a 41). Como se puede apreciar en las tablas, la población de P.strombulifera de Catamarca para / GOT-A se aparta significativamente del equilibrio ( $p < 0.01$ ). Lo mismo sucede en P.reptans para GOT-B. En estos casos hubo exceso de homocigotas.

Dado que no hay evidencias experimentales que indiquen que las especies de Strombocarpa sean autoincompatibles, como en el caso de las especies de la Sección Algarobia, tal vez el exceso de homocigotas pueda explicarse por autofecundación si fueran al menos parcialmente autógamas. Pruebas con cruzamientos controlados deberían realizarse para probar esta hipótesis.

Tabla 36. Comparación de las frecuencias genotípicas absolutas observadas y esperadas para el locus Got-A en P.strombulifera (Catamarca).

Genotipos Propuestos	N° Observados	N° Esperados
Got-A <sup>1/1</sup>	26	12.25
Got-A <sup>1/2</sup>	18	45.50
Got-A <sup>2/2</sup>	56	42.25

---

$\chi^2_1 = 36.52; p \approx 0$

Tabla 37. Comparación de las frecuencias genotípicas absolutas observadas y esperadas para el locus Got-B en P.strombulifera (Catamarca).

Genotipos Propuestos	N° Observados	N° Esperados
Got-B <sup>1/1</sup>	32	29.75
Got-B <sup>1/2</sup>	44	48.49
Got-B <sup>2/2</sup>	22	19.76

---

$\chi^2_1 = 0.86; p = 0.35$

Tabla 38. Comparación de las frecuencias genotípicas absolutas observadas y esperadas para el locus Got-A en P.strombulifera (Río Negro).

Genotipos Propuestos	N° Observados	N° Esperados
Got-A <sup>1/1</sup>	1	0.36
Got-A <sup>1/2</sup>	10	11.28
Got-A <sup>2/2</sup>	89	88.36

---

$\chi^2_1 = 1.28; p = 0.26$

Tabla 39. Comparación de las frecuencias genotípicas absolutas observadas y esperadas para el locus Got-B en P.strombulifera (Río Negro).

Genotipos Propuestos	N° Observados	N° Esperados
Got-B <sup>1/1</sup>	4	6.76
Got-B <sup>1/2</sup>	44	38.48
Got-B <sup>2/2</sup>	52	54.76

$\chi^2_1 = 2.05; p = 0.15$

Tabla 40. Frecuencias genotípicas absolutas observadas y esperadas para el locus Got-A en P.reptans (Sgo. del Estero).

Genotipos Propuestos	N° Observados	N° Esperados
Got-A <sup>1/1</sup>	0	0.20
Got-A <sup>1/2</sup>	9	8.60
Got-A <sup>2/2</sup>	91	91.20

Tabla 41. Comparación de las frecuencias genotípicas absolutas observadas y esperadas para el locus Got-B en P. reptans (Sgo. del Estero).

Genotipos Propuestos	N° Observados	N° Esperados
Got-B <sup>1/1</sup>	17	7.56
Got-B <sup>1/2</sup>	21	39.88
Got-B <sup>2/2</sup>	62	52.56

$\chi^2_1 = 22.42; p \approx 0$

ESTERASA E.C. 3,1,1, (EST)

Selección de los órganos analizados.

En este sistema Isoenzimático se realizaron las mismas pruebas indicadas para los anteriores. La mejor resolución de las bandas se obtuvo, en todas las especies, en cotiledón de 7 días (cuando se cae el tegumento), y con los datos provenientes de los estudios de este órgano se realizaron los análisis estadísticos. Los demás órganos (epicótilo e hipocótilo) así como diferentes períodos del desarrollo fueron utilizados para determinar los posibles loci y alelos en las poblaciones de P.ruscifolia, complementando estas pruebas con la utilización de diferentes sustratos. En el resto de las especies, las pruebas de alelismo se realizaron utilizando solamente // distintos sustratos, en cotiledones, epicótilo e hipocótilo de plántulas/ de 7 días.

En ambas secciones, las esterases presentaron patrones Isoenzimáticos muy complejos, sujetos a problemas de regulación, que hicieron en muchos casos muy difícil su interpretación y análisis.

Sección Algarobía:

Semillas 24 hs. después de iniciada la germinación (Sustratos utilizados:

$\alpha$ NA y  $\beta$ NA).

Este estadio solamente fue estudiado en las diferentes poblaciones/ de P.ruscifolia. En la provincia de Formosa esta especie presentó las bandas EST-1, EST-3, EST-4, EST-5, EST-6 y EST-7, numeradas en orden decreciente de velocidad de migración. En los Dptos. de Avellaneda y Copo de la provin-

cia de Santiago del Estero, se observaron las siguientes bandas, EST-2, EST-3, EST-4, EST-5, EST-6 y EST-7, mientras que en la provincia de Chaco, sólo se encontraron las bandas EST-3, EST-4, EST-5, EST-6 y EST-7 (Fig.7).

Plántulas con 7 y 13 días de germinación. (Cotiledones, epicótilo e hipocótilo. Sustrato utilizado :  $\alpha$  NA)

A excepción hecha de la banda EST-1 característica de la población/formoseña de P.ruscifolia que solamente se encuentra en semillas de 24 hs./de germinación, los restantes estadios y órganos en las poblaciones de P.ruscifolia mantuvieron los mismos patrones isoenzimáticos descritos en semilla (Fig. 8 A, muestras 1-4). Las bandas en epicótilo e hipocótilo, mostraron una intensidad de coloración menor que la observada en los cotiledones (Fig. 7 B).

Los individuos de las demás especies de esta sección mostraron en cotiledón, epicótilo e hipocótilo las siguientes bandas: EST-2, EST-3, EST-4, EST-5, EST-6 y EST-7 (Fig. 8 A, muestras 5-11; B). Al igual que en P.ruscifolia, en cotiledón la coloración fue más intensa que en los otros dos órganos.

#### Reacción de las esterasas frente a los diferentes sustratos.

En la mayoría de las especies de esta Sección, se han individualizado dos zonas con actividad esterásica en base a su capacidad de reaccionar/frente a una mezcla de  $\alpha$  y  $\beta$  NA.

Las bandas de la zona I (EST-1 a EST-4) reaccionan preferentemente // con  $\beta$  NA, produciendo bandas de color rojo. La zona II (EST-5 a EST-7) frente a esta misma mezcla de sustratos reacciona con  $\alpha$  NA, produciendo bandas

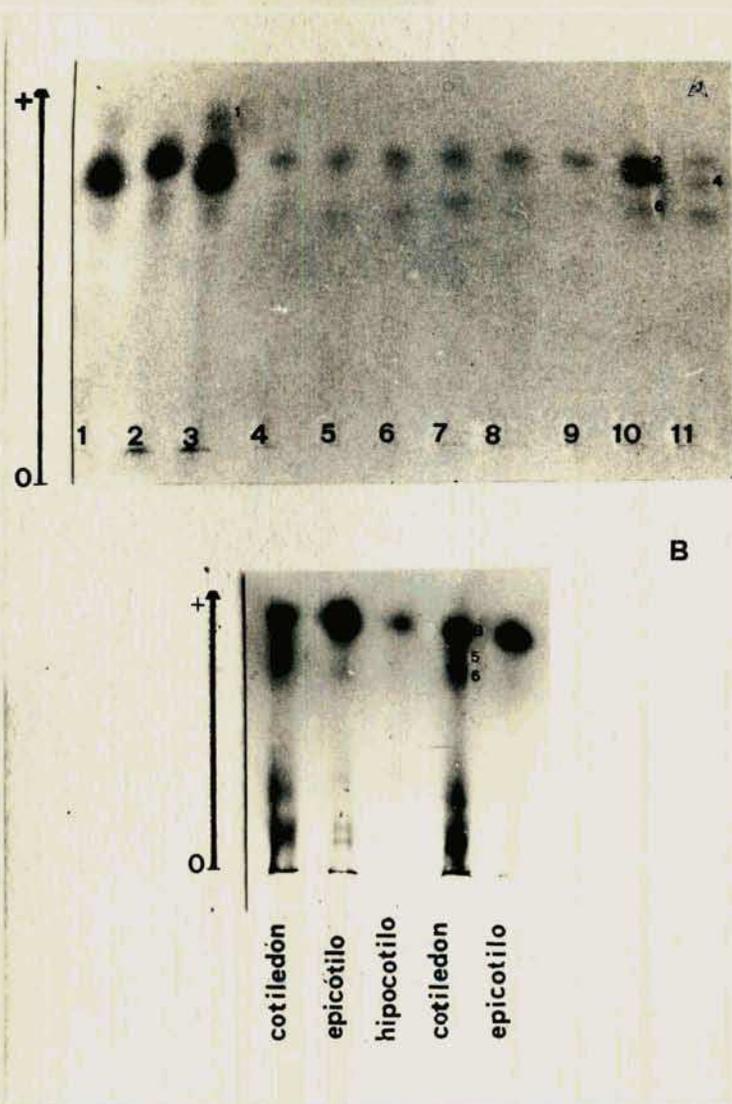


Figura 7. A y B) Zimograma de esterases de individuos de *P. ruscifolia*. A) Esterases en semillas con 24 hs después de iniciada la germinación en diferentes poblaciones, reveladas con  $\beta$ NA. Las bandas aparecen de color rojo. Se observan las bandas 1 (EST-1) (presente sólo en los individuos de Formosa) y las 2, 3, 4 y 6 (EST-2, EST-3, EST-4 y EST-6). Están ausentes las bandas 5 y 7 (EST-5 y EST-7), que no reaccionan con este sustrato. 1-6, población de Formosa (307, 313, 321, 332, 334, 478); 7-11, población de Chaco (526, 527, 530, 531, 533). B) Esterases en cotiledones, epicótilo e hipocótilo en plántulas de trece días, reveladas con  $\alpha$ NA y  $\beta$ NA. Se observa la banda 3 (EST-3) que se tiñe de rojo intensamente mientras que 5 y 6 (EST-5 y EST-6), lo hacen tenuemente de marrón.

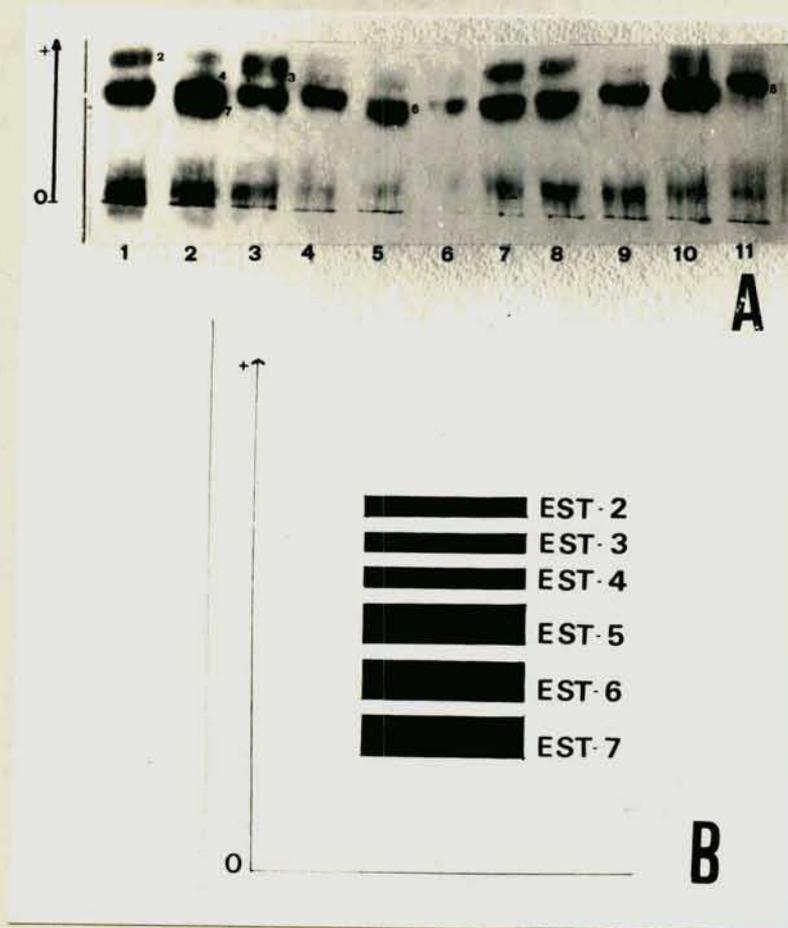


Figura 8. A) Zimograma de esterases en cotiledones de 7 días de individuos de especies de la Sección Algarobia: 1-4, *P. ruscifolia* (307, 531, 571, 149); 5 y 6, *P. nigra* (141, 438); 7, *P. alba* (315); 8, *P. hassleri* (311); 9, *P. alpataco* (112); 10, *P. flexuosa* (132); 11, *P. caldenia* (124); En el zimograma A) se indican los números de las bandas siguiendo la nomenclatura esquematizada en B. B) Esquema de las bandas observadas en los individuos analizados.

de color marrón,

La banda EST-1, sólo fue observada en tres individuos de P.ruscifolia de Formosa, en los cuales se estudió el estadio de semillas 24 hs. después de la germinación (Fig. 7 A, muestras 1 y 3). Las restantes bandas de la zona I, pudieron observarse en todos los órganos y períodos del desarrollo, pero los patrones variaban para distintos individuos. Para estas bandas en P.ruscifolia de Formosa y Chaco se observaron individuos con tres tipos de patrones diferentes: EST-3, EST-4 o simultáneamente EST-3 y EST-4. Las demás poblaciones de P.ruscifolia y las restantes especies presentaban también individuos con patrones compuestos por 1 ó 2 bandas, pero se observaron seis fenotipos posibles: EST-2, EST-3, EST-4, EST-2 y EST-3, EST-2 y EST-4 ó EST-3 y EST-4.

Las bandas de la zona II también pudieron verse en todos los órganos y períodos del desarrollo. Se detectó variación entre las especies y también entre individuos de la misma población. En P.caldenia los patrones de los individuos podían presentar una banda (EST-5, EST-6 ó EST-7), dos bandas (EST-5 y EST-6, EST-5 y EST-7 ó EST-6 y EST-7) o ninguna banda. En las demás especies de esta Sección todos los individuos presentaban la banda EST-6, a la cual se podían sumar: la banda EST-5, EST-7, ambas o ninguna.

La variación de la intensidad de las bandas en los diferentes órganos y en distintos períodos del desarrollo, utilizando los sustratos  $\alpha$  y  $\beta$  NA fue estudiada en P.ruscifolia (Tabla 42).

En la semilla 24 hs. después de la germinación la banda EST-1 reacciona con gran intensidad con  $\beta$  NA. Las bandas EST-2, EST-3 y EST-4 se tiñen intensamente con  $\alpha$  ó  $\beta$  NA. La banda EST-6 se tiñe también con ambos sustratos, aunque menos intensamente con  $\beta$  NA, y frente a una mezcla, como se explicó anteriormente, reacciona preferentemente con  $\alpha$  NA, tiñéndose de

Tabla 42. Comparación de la intensidad de tinción de las bandas con actividad de esterasas en distintos órganos y estadios del desarrollo, usando acetato de  $\alpha$ naftilo ( $\alpha$ NA) y acetato de  $\beta$ naftilo ( $\beta$ NA) en diferentes poblaciones de *P. ruscifolia*. Intensidad de tinción: +++= intensa, ++= media, += tenue, /--= tenue o ausente, ---= ausente.

BANDAS	ESTADIOS DEL DESARROLLO													
	24 horas		Siete días						Trece o más días					
	SEMILLA COMPLETA		COTILEDON		ÉPICOTILO		HIPOCOTILO		COTILEDON		ÉPICOTILO		HIPOCOTILO	
	$\alpha$ NA	$\beta$ NA	$\alpha$ NA	$\beta$ NA	$\alpha$ NA	$\beta$ NA	$\alpha$ NA	$\beta$ NA	$\alpha$ NA	$\beta$ NA	$\alpha$ NA	$\beta$ NA	$\alpha$ NA	$\beta$ NA
EST-1	---	+++	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
EST-2	+++	+++	+++	+++	++-	++-	++-	++-	+++	+++	++-	++-	++-	++-
EST-3	+++	+++	+++	+++	++-	++-	++-	++-	+++	+++	++-	++-	++-	++-
EST-4	+++	+++	+++	+++	++-	++-	++-	++-	+++	+++	++-	++-	++-	++-
EST-5	+++	---	+++	---	++-	---	++-	---	++-	---	/--	---	/--	---
EST-6	+++	++-	+++	++-	++-	/--	++-	/--	++-	---	/--	---	/--	---
EST-7	+++	---	+++	---	++-	---	++-	---	++-	---	/--	---	/--	---

marrón. Las bandas EST-5 y EST-7 sólo se tiñen con  $\alpha$  NA.

Al estudiar cotiledones de 13 o más días después de la germinación, las bandas 5, 6 y 7 tienden a hacerse más tenues hasta casi desaparecer. Las bandas 2, 3 y 4 en cambio se mantienen teñidas intensamente. Lo mismo sucede en epicótilo e hipocótilo, a pesar de que siempre en estos órganos la intensidad de las bandas es menor que en cotiledón (Tabla 42). La banda EST-1 como ya se indicó, está ausente en estos períodos del desarrollo.

En las demás especies de esta Sección, no ha sido posible estudiar el comportamiento de las bandas a lo largo del desarrollo, debido a que éste era extremadamente complejo y con pequeños cambios de tamaño de la plántula, intensidad de luz, humedad, etc., variaban mucho su expresión.

Además de  $\alpha$  y  $\beta$  NA, se utilizaron otros sustratos que fueron ensayados en cotiledones de 7 días, en todas las poblaciones de las diferentes especies de esta sección (Tabla 43 y Materiales y Métodos).

Las bandas EST-2, EST-3 y EST-4 además de reaccionar con  $\alpha$  NA y  $\beta$  NA, reaccionan intensamente con  $\alpha$  NB,  $\alpha$  NS y  $\alpha$  NP, y tenuemente con  $\beta$  NO y  $\alpha$  NM. La banda EST-5 reacciona intensamente con  $\alpha$  NA y  $\alpha$  NP, levemente con  $\beta$  NO y  $\alpha$  NM y no presenta reacción con  $\alpha$  NB,  $\beta$  NA ni  $\alpha$  NS. La banda EST-7 no reacciona con  $\beta$  NA ni con  $\alpha$  NB, y lo hace tenuemente con  $\alpha$  NS,  $\beta$  NO y  $\alpha$  NM e intensamente con  $\alpha$  NA y  $\alpha$  NP. Finalmente la banda EST-6 reacciona intensamente con  $\alpha$  NA y  $\alpha$  NP y levemente con  $\beta$  NA y  $\alpha$  NS, muy levemente con  $\beta$  NO y  $\alpha$  NM y no reacciona con  $\alpha$  NB (Tabla 43).

Al estudiar las semillas provenientes de posibles híbridos o introgresantes, se observaron los mismos patrones de bandas descritas para sus probables progenitores. Al ensayar todos los diferentes sustratos en estos individuos las bandas reaccionaron frente a ellos de la misma manera descrita en plántulas provenientes de árboles que no mostraban indicios de /

Tabla 43: Comparación de la intensidad de tinción de las bandas con actividad de esterases en cotiledones, epicótilo e hipocótilo de 7 días, usando diferente sustratos, en poblaciones de especies de la Sección Algarobia. Intensidad de tinción: +++= intensa, ++= media, +== tenue, /--= tenue o ausente, ----= ausente. Sustratos:  $\alpha$ NA= acetato de  $\alpha$ -naftilo;  $\beta$ NA= acetato de  $\beta$ -naftilo,  $\alpha$ NP= propionato de  $\alpha$ -naftilo,  $\alpha$ NB= butirato de naftilo,  $\alpha$ NS= estearato de  $\alpha$ -naftilo,  $\beta$ NO= oleato de  $\beta$ -naftilo,  $\alpha$ NM= meristato de  $\alpha$ -naftilo. Especies: P. ruscifolia, P. nigra, P. alba, P. hassleri, P. flexuosa, P. alpataco y P. caldenia.

O R G A N O S

BANDAS	COTILEDON						EPICOTILO						HIPOCOTILO								
	$\alpha$ NA	$\beta$ NA	$\alpha$ NP	$\alpha$ NB	$\alpha$ NS	$\beta$ NO	$\alpha$ NM	$\alpha$ NA	$\beta$ NA	$\alpha$ NP	$\alpha$ NB	$\alpha$ NS	$\beta$ NO	$\alpha$ NM	$\alpha$ NA	$\beta$ NA	$\alpha$ NP	$\alpha$ NB	$\alpha$ NS	$\beta$ NO	$\alpha$ NM
EST-2	+++	+++	+++	+++	+++	/--	+++	++	++	++	++	---	/--	++	++	++	++	++	---	---	/--
EST-3	+++	+++	+++	+++	+++	/--	+++	++	++	++	++	---	/--	++	++	++	++	++	---	---	/--
EST-4	+++	+++	+++	+++	+++	/--	+++	++	++	++	++	---	/--	++	++	++	++	++	---	---	/--
EST-5	+++	---	+++	---	---	/--	/--	++	---	++	---	---	/--	++	++	++	++	---	---	---	/--
EST-6	+++	+++	+++	---	+++	/--	/--	++	/--	++	---	---	/--	++	++	/--	---	---	---	---	/--
EST-7	+++	---	+++	---	+++	/--	/--	++	---	++	---	---	/--	++	++	++	++	---	---	---	/--

hibridación.

Determinación de los probables loci y alelos.

De acuerdo a los resultados observados y a los criterios mencionados en el método de determinación de geles y alelos (Ver Materiales y Métodos), se postuló la siguiente hipótesis:

- a) Existiría una isoenzima EST-1 que estaría codificada por un gen que posee un solo alelo activo en algunos de los individuos de P.ruscifolia de la población de Formosa y que únicamente se manifiesta en los primeros días de crecimiento de la plántula. A este locus se lo denominó Est-1.
- b) Dadas las diferentes combinaciones con que aparecen las bandas EST-2, EST-3 y EST-4 y las reacciones frente a los diferentes sustratos podrían estar codificadas con un gen por dos alelos codominantes en P.ruscifolia de Formosa y Chaco o tres alelos codominantes en todas las demás poblaciones de las especies de esta Sección. Este locus fue denominado Est-2 y sus alelos Est-2<sup>1</sup>, Est-2<sup>2</sup> y Est-2<sup>3</sup> (en orden decreciente de movilidad de sus correspondientes bandas). La ausencia de bandas híbridas (heteropolímeros) indica que dichas alozimas podrían ser monoméricas. Sin embargo esto no puede asegurarse dado que la ausencia de bandas híbridas no siempre implica que las alozimas sean monoméricas (Ferris y Whitt, 1978).
- c) La banda EST-6 por presentar un comportamiento diferencial con respecto a las otras bandas de la zona II, en relación con su afinidad por los diferentes sustratos, estaría codificada por un gen particular al que se denominó Est-4. Dado el patrón uniforme de aparición de la banda EST-6 en la mayoría de las especies estudiadas, éste gen sería monomórfico. Sin embargo en P.caldenia se encontraron individuos que presentaban la banda EST-6 y otros que carecían de ella. En esta especie se supuso que Est-4 presentaría dos/

alelos, uno de los cuales sería nulo (inactivo), y que por lo tanto, en homocigosis produciría ausencia de la banda y otro activo que daría presencia de la misma cuando estuviese en homocigosis o en heterocigosis. Los alelos/ del locus Est-4 en P.caldenia, fueron denominados Est-4<sup>0</sup> (Alelo nulo) y // Est-4<sup>1</sup> (Alelo activo).

d) A pesar de las diferentes combinaciones con que aparecen las bandas /// EST-5 y EST-7 y su comportamiento tan semejante utilizando  $\alpha$  NA y  $\beta$  NA en las poblaciones de P.ruscifolia (Tabla 42), que podrían sugerir que estas / isoenzimas estuviesen codificadas por un gen con 3 alelos, siendo uno de // ellos nulo o inactivo, los resultados obtenidos al utilizar los otros sus- / tratos (Tabla 43), hicieron suponer que cada banda estaría codificada por / un gen diferente Est-3 y Est-5 respectivamente, cada uno de ellos con un // alelo nulo o inactivo (Est-3<sup>0</sup> y Est-5<sup>0</sup>) y otro activo (Est-3<sup>1</sup> y Est-5<sup>1</sup>).

En el siguiente cuadro se dan los diferentes fenotipos observados / (Bandas), correspondientes a los distintos genotipos postulados.

LOCI PROPUESTOS	GENOTIPOS PROPUESTOS	BANDAS
Est-1	Est-1 1/1	EST-1
Est-2	Est-2 1/1	EST-2
	Est-2 2/2	EST-3
	Est-2 3/3	EST-4
	Est-2 1/2	EST-2- y EST-3
	Est-2 1/3	EST-2- y EST-4
	Est-2 2/3	EST-3- y EST-4
Est-3	Est-3 0/0	Ausencia de bandas
	Est-3 1/1 y Est-3 <sup>1</sup> /0	EST-5

LOCI PROPUESTOS	GENOTIPOS PROPUESTOS	BANDAS
Est-4	Est-4 <sup>0/0</sup> Est-4 <sup>1/1</sup> y Est-4 <sup>1/0</sup>	Ausencia de bandas. EST-6
Est-5	Est-5 <sup>0/0</sup> Est-5 <sup>1/1</sup> y Est-5 <sup>1/0</sup>	Ausencia de bandas EST-7

En base a los números observados (Tablas 44, 55, 59-80), se obtuvieron las frecuencias génicas (Tabla 119) y genotípicas de los loci Est-2, Est-3, Est-4 y Est-5 para todas las especies. Para determinar si las frecuencias genotípicas observadas del locus Est-2 se ajustaban a las esperadas para un equilibrio de Hardy y Weinberg, se utilizó la prueba de  $\chi^2$  (Tablas 44, 47, 50, 53, 59, 62, 65, 68, 71, 75, 78). Como se puede apreciar, solamente en P.ruscifolia de Chaco y P.hassleri (Tablas 53 y 65) las desviaciones fueron significativas ( $p < 0.05$ ). En estos casos las frecuencias de los homocigotas fueron mayores que las esperadas.

Las poblaciones de P.ruscifolia fueron comparadas mediante una tabla de contingencia para ver si existían diferencias significativas en las frecuencias fenotípicas de los loci Est-2, Est-3 y Est-5 (Tablas 56, 57 y 58). Como se puede apreciar, los resultados indican que las diferencias no son significativas para el locus Est-2 ( $p > 0.05$ ) cuando se comparan las poblaciones de Avellaneda y Copo, así como las poblaciones de Formosa y Chaco (Tabla 56, A y B). Por otra parte, las poblaciones de Stgo. del Estero (Avellaneda y Copo) se diferencian de las de Formosa y Chaco por poseer un alelo más.

Al realizar las comparaciones entre las 4 poblaciones de P.ruscifolia se observaron diferencias significativas para el locus Est-5 ( $p < 0.05$ ) / (Tabla 58 A); sin embargo, cuando se analizaron en conjunto para este mismo locus sólo las poblaciones de Avellaneda, Formosa y Chaco, el estadístico no

Tabla 44. Comparación de la frecuencias genotípicas absolutas observadas y esperadas para el locus Est-2 en P.ruscifolia (Copo).

Genotipos Propuestos	N° Observados	N° Esperados
Est-2 <sup>1/1</sup>	1	0.35
Est-2 <sup>1/2</sup>	6	5.89
Est-2 <sup>1/3</sup>	2	3.34
Est-2 <sup>2/2</sup>	26	24.62
Est-2 <sup>2/3</sup>	25	27.90
Est-2 <sup>3/3</sup>	10	7.90

$$\chi^2_3 = 2.68; p = 0.44$$

Tabla 45. Frecuencias fenotípicas absolutas observadas para el locus Est-3 en P. ruscifolia (Copo).

Genotipos Propuestos	N° Observados
Est-3 <sup>1/1</sup> + Est-3 <sup>1/0</sup>	32
Est-3 <sup>0/0</sup>	41

Tabla 46. Frecuencias fenotípicas absolutas observadas para el locus Est-5 en P.ruscifolia (Copo).

Genotipos Propuestos	N° Observados
Est-5 <sup>1/1</sup> + Est-5 <sup>1/0</sup>	64
Est-5 <sup>0/0</sup>	9

Tabla 47. Comparación de las frecuencias genotípicas absolutas observadas y esperadas para el locus Est-2 en P. ruscifolia (Avellaneda)

Genotipos Postulados	N° Observados	N° Esperados
Est-2 <sup>1/1</sup>	2	0.61
Est-2 <sup>1/2</sup>	6	7.25
Est-2 <sup>1/3</sup>	3	4.56
Est-2 <sup>2/2</sup>	25	21.72
Est-2 <sup>2/3</sup>	22	27.29
Est-2 <sup>3/3</sup>	12	8.57

$\chi^2_3 = 6.81; p = 0.08$

Tabla 48. Frecuencias fenotípicas absolutas observadas para el locus Est-3 en P. ruscifolia (Avellaneda).

Genotipos Postulados	N° Observados
Est-3 <sup>1/1</sup> + Est-3 <sup>1/0</sup>	36
Est-3 <sup>0/0</sup>	41

Tabla 49 Frecuencias fenotípicas absolutas observadas para el locus Est-5 en P. ruscifolia (Avellaneda)

Genotipos Postulados	N° Observados
Est-5 <sup>1/1</sup> + Est-5 <sup>1/0</sup>	55
Est-5 <sup>0/0</sup>	24

Tabla 50. Comparación de las frecuencias genotípicas absolutas observadas y esperadas para el locus Est-2 en P. ruscifolia (Formosa)

Genotipos Propuestos	N° Observados	N° Esperados
Est-2 <sup>2/2</sup>	20	18.39
Est-2 <sup>2/3</sup>	7	10.20
Est-2 <sup>3/3</sup>	3	1.41
$\chi^2_1 = 2.94; p = 0.09$		

Tabla 51. Frecuencias fenotípicas absolutas observadas para el locus Est-3 en P. ruscifolia (Formosa).

Genotipos Propuestos	N° Observados
Est-3 <sup>1/1</sup> + Est-3 <sup>1/0</sup>	18
Est-3 <sup>0/0</sup>	27

Tabla 52. Frecuencias fenotípicas absolutas observadas para el locus Est-5 en P. ruscifolia (Formosa).

Genotipos Propuestos	N° Observados
Est-5 <sup>1/1</sup> + Est-5 <sup>1/0</sup>	39
Est-5 <sup>0/0</sup>	17

Tabla 53. Comparación de las frecuencias genotípicas absolutas observadas y esperadas para el locus Est-2 en P. ruscifolia (Chaco).

Genotipos Propuestos	N° Observados	N° Esperados
Est-2 <sup>2/2</sup>	35	31.85
Est-2 <sup>2/3</sup>	16	22.26
Est-2 <sup>3/3</sup>	7	3.89

$$\chi_1^2 = 4.56; p = 0.03$$

Tabla 54. Frecuencias fenotípicas absolutas observadas para el locus Est-3 en P. ruscifolia (Chaco).

Genotipos Propuestos	N° Observados
Est-3 <sup>1/1</sup> + Est-3 <sup>1/0</sup>	37
Est-3 <sup>0/0</sup>	23

Tabla 55. Frecuencias fenotípicas absolutas observadas para el locus Est-5 en P. ruscifolia (Chaco).

Genotipos Propuestos	N° Observados
Est-5 <sup>1/1</sup> + Est-5 <sup>1/0</sup>	49
Est-5 <sup>0/0</sup>	10

Tabla 56. Tabla de contingencia para comparar las frecuencias genotípicas absolutas del locus Est-2 en las diferentes poblaciones de P. ruscifolia.

A)

Poblaciones	Genotipos Propuestos					
	Est-2 <sup>1/1</sup>	Est-2 <sup>1/2</sup>	Est-2 <sup>1/3</sup>	Est-2 <sup>2/2</sup>	Est-2 <sup>2/3</sup>	Est-2 <sup>3/3</sup>
Avellaneda	2	6	3	25	22	12
Copo	1	6	2	26	25	10

$$\chi^2_5 = 0.93; p = 0.97$$

B)

Poblaciones	Genotipos Propuestos		
	Est-2 <sup>2/2</sup>	Est-2 <sup>2/3</sup>	Est-2 <sup>3/3</sup>
Formosa	20	7	3
Chaco	35	16	7

$$\chi^2_2 = 0.34; p = 0.84$$

Tabla 57. Tabla de contingencia para comparar las frecuencias fenotípicas absolutas del locus Est-3 en las diferentes poblaciones de P. ruscifolia.

Poblaciones	Genotipos Propuestos	
	Est-3 <sup>1/1</sup> + Est-3 <sup>1/0</sup>	Est-3 <sup>0/0</sup>
Avellaneda	36	41
Copo	54	31
Formosa	18	27
Chaco	37	23

$$\chi^2_3 = 9.71; p = 0.02$$

Tabla 58 .Tabla de contingencia para comparar las frecuencias fenotípicas absolutas del locus Est-5 en las diferentes poblaciones de P. ruscifolia.

A)

Poblaciones	Genotipos Propuestos	
	Est-5 <sup>1/1</sup> + Est-5 <sup>1/0</sup>	Est-5 <sup>0/0</sup>
Avellaneda	55	24
Copo	64	9
Formosa	39	17
Chaco	49	10

$\chi^2_3 = 10.18; p = 0.02$

B)

Poblaciones	Genotipos Propuestos	
	Est-5 <sup>1/1</sup> + Est-5 <sup>1/0</sup>	Est-5 <sup>0/0</sup>
Avellaneda	55	24
Formosa	39	17
Chaco	49	10

$\chi^2_2 = 3.82; p = 0.15$

Tabla 59. Comparación de las frecuencias genotípicas absolutas observadas y esperadas para el locus Est-2 en P. nigra (Sgo. del Estero).

Genotipos Propuestos	Nº Observados	Nº Esperados
Est-2 <sup>1/1</sup>	0	0.35
Est-2 <sup>1/2</sup>	5	5.19
Est-2 <sup>1/3</sup>	5	4.05
Est-2 <sup>2/2</sup>	20	19.07
Est-2 <sup>2/3</sup>	28	29.74
Est-2 <sup>3/3</sup>	12	11.60

$\chi^2_2 = 0.44; p = 0.81$

Tabla 60. Frecuencias fenotípicas absolutas observadas para el locus Est-3 en P. nigra (Sgo. del Estero) .

Genotipos Propuestos	N° Observados
Est-3 <sup>1/1</sup> + Est-3 <sup>1/0</sup>	53
Est-3 <sup>0/0</sup>	31

Tabla 61. Frecuencias fenotípicas absolutas observadas para el locus Est-5 en P. nigra (Sgo. del Estero).

Genotipos Propuestos	N° Observados
Est-5 <sup>1/1</sup> + Est-5 <sup>1/0</sup>	39
Est-5 <sup>0/0</sup>	42

Tabla 62. Comparación de las frecuencias genotípicas absolutas observadas y esperadas para el locus Est-2 en P. nigra (Entre Ríos).

Genotipos Propuestos	N° Observados	N° Esperados
Est-2 <sup>1/1</sup>	3	1.43
Est-2 <sup>1/2</sup>	14	12.29
Est-2 <sup>1/3</sup>	0	4.87
Est-2 <sup>2/2</sup>	25	26.39
Est-2 <sup>2/3</sup>	22	20.89
Est-2 <sup>3/3</sup>	6	4.13

17.16

$\chi^2_2 = 3.28; p = 0.19$

Tabla 63. Frecuencias fenotípicas absolutas observadas para el locus Est-3 en P. nigra (Entre Ríos).

Genotipos Propuestos	Nº Observados
Est-3 <sup>1/1</sup> + Est-3 <sup>1/0</sup>	69
Est-3 <sup>0/0</sup>	10

Tabla 64. Frecuencias fenotípicas absolutas observadas para el locus Est-5 en P. nigra (Entre Ríos).

Genotipos Propuestos	Nº Observados
Est-5 <sup>1/1</sup> + Est-5 <sup>1/0</sup>	32
Est-5 <sup>0/0</sup>	40

Tabla 65. Comparación de las frecuencias genotípicas absolutas observadas y esperadas para el locus Est-2 en P. hassleri (Formosa).

Genotipos Propuestos	Nº Observados	Nº Esperados
Est-2 <sup>1/1</sup>	2	0.68
Est-2 <sup>1/2</sup>	7	8.14
Est-2 <sup>1/3</sup>	3	4.47
Est-2 <sup>2/2</sup>	33	24.47
Est-2 <sup>2/3</sup>	11	26.87
Est-2 <sup>3/3</sup>	16	7.37

$$\chi^2_3 = 22.62; p \approx 0$$

Tabla 66. Frecuencias fenotípicas absolutas observadas para el locus Est-3 en P. hassleri (Formosa).

Genotipos Propuestos	Nº Observados
Est-3 <sup>1/1</sup> + Est-3 <sup>1/0</sup>	36
Est-3 <sup>0/0</sup>	41

Tabla 67. Frecuencias fenotípicas absolutas observadas para el locus Est-5 en P. hassleri (Formosa).

Genotipos Propuestos	Nº Observados
Est-5 <sup>1/1</sup> + Est-5 <sup>1/0</sup>	20
Est-5 <sup>0/0</sup>	57

Tabla 68. Comparación de las frecuencias genotípicas absolutas observadas y esperadas para el locus Est-2 en P. alba (Formosa).

Genotipos Propuestos	Nº Observados	Nº Esperados
Est-2 <sup>1/1</sup>	14	10.11
Est-2 <sup>1/2</sup>	19	20.48
Est-2 <sup>1/3</sup>	6	12.50
Est-2 <sup>2/2</sup>	10	10.38
Est-2 <sup>2/3</sup>	15	12.66
Est-2 <sup>3/3</sup>	6	3.87

$$\chi_3^2 = 6.60; p = 0.09$$

Tabla 69. Frecuencias fenotípicas absolutas observadas para el locus Est-3 en P. alba (Formosa).

Genotipos Propuestos	Nº Observados
Est-3 <sup>1/1</sup> + Est-3 <sup>1/0</sup>	43
Est-3 <sup>0/0</sup>	38

Tabla 70. Frecuencias fenotípicas absolutas observadas para el locus Est-5 en P. alba (Formosa).

Genotipos Propuestos	Nº Observados
Est-5 <sup>1/1</sup> + Est-5 <sup>1/0</sup>	14
Est-5 <sup>0/0</sup>	68

Tabla 71. Comparación de las frecuencias genotípicas absolutas observadas y esperadas para el locus Est-2 en P. caldenia (Santa Rosa).

Genotipos Propuestos	Nº Observados	Nº Esperados
Est-2 <sup>1/1</sup>	7	5.88
Est-2 <sup>1/2</sup>	20	22.28
Est-2 <sup>1/3</sup>	14	13.97
Est-2 <sup>2/2</sup>	22	21.10
Est-2 <sup>2/3</sup>	27	26.47
Est-2 <sup>3/3</sup>	8	8.30

$$\chi^2_3 = 0.61; p = 0.89$$

Tabla 72. Frecuencias fenotípicas absolutas observadas para el locus Est-3 en P. caldenia (Santa Rosa).

Genotipos Propuestos	Nº Observados
Est-3 <sup>1/1</sup> + Est-3 <sup>1/0</sup>	36
Est-3 <sup>0/0</sup>	41

Tabla 73. Frecuencias fenotípicas absolutas observadas para el locus Est-4 en P. caldenia (Santa Rosa).

Genotipos Propuestos	Nº Observados
Est-4 <sup>1/1</sup> + Est-4 <sup>1/0</sup>	64
Est-4 <sup>0/0</sup>	13

Tabla 74. Frecuencias fenotípicas absolutas observadas para el locus Est-5 en P. caldenia (Santa Rosa).

Genotipos Propuestos	Nº Observados
Est-5 <sup>1/1</sup> + Est-5 <sup>1/0</sup>	32
Est-5 <sup>0/0</sup>	47

Tabla 75. Comparación de las frecuencias genotípicas absolutas observadas y esperadas para el locus Est-2 en P. flexuosa (Cura-Có).

Genotipos Propuestos	NºObservados	NºEsperados
Est-2 <sup>1/1</sup>	2	2.67
Est-2 <sup>1/2</sup>	19	16.51
Est-2 <sup>1/3</sup>	9	10.20
Est-2 <sup>2/2</sup>	25	25.46
Est-2 <sup>2/3</sup>	30	31.45
Est-2 <sup>3/3</sup>	11	9.71

$$\chi^2_3 = 0.94; p = 0.82$$

Tabla 76. Frecuencias fenotípicas absolutas observadas para el locus Est-3 en P. flexuosa (Cura-Có).

Genotipos Propuestos	NºObservados
Est-3 <sup>1/1</sup> + Est-3 <sup>1/0</sup>	32
Est-3 <sup>0/0</sup>	50

Tabla 77. Frecuencias fenotípicas absolutas observadas para el locus Est-5 en P. flexuosa (Cura-Có)

Genotipos Propuestos	NºObservados
Est-5 <sup>1/1</sup> + Est-5 <sup>1/0</sup>	38
Est-5 <sup>0/0</sup>	49

Tabla 78. Comparación de las frecuencias genotípicas absolutas observadas y esperadas para el locus Est-2 en P. alpataco (Chacharramendi).

Genotipos Propuestos	Nº Observados	Nº Esperados
Est-2 <sup>1/1</sup>	17	16.19
Est-2 <sup>1/2</sup>	30	32.38
Est-2 <sup>1/3</sup>	14	13.26
Est-2 <sup>2/2</sup>	17	16.19
Est-2 <sup>2/3</sup>	14	13.26
Est-2 <sup>3/3</sup>	2	2.72

$$\chi^2_3 = 0.53; p = 0.91$$

Tabla 79. Frecuencias fenotípicas absolutas observadas para el locus Est-3 en P. alpataco (Chacharramendi).

Genotipos Propuestos	Nº Observados
Est-3 <sup>1/1</sup> + Est-3 <sup>1/0</sup>	6
Est-3 <sup>0/0</sup>	72

Tabla 80. Frecuencias fenotípicas absolutas observadas para el locus Est-5 en P. alpataco (Chacharramendi)

Genotipos Propuestos	Nº Observados
Est-5 <sup>1/1</sup> + Est-5 <sup>1/0</sup>	18
Est-5 <sup>0/0</sup>	56

fue significativo ( $p > 0,05$ ) (Tabla 58 B),

Las cuatro poblaciones mostraron diferencias significativas cuando/// se compararon sus frecuencias genotípicas para el locus Est-3 ( $p < 0,05$ ) (Tabla 57).

### Sección Strombocarpa

En las poblaciones de las especies estudiadas en esta Sección se detec tó un total de 12 bandas anódicas EST-1 a EST-12, numeradas en orden decrecien te de velocidad de migración anódica (Fig. 9 A y B). Estas fueron observadas en cotiledón, epicótilo e hipocótilo de plántulas con siete días de germinación. Se utilizaron diferentes sustratos para observar la reacción de cada / una de las isoenzimas frente a los mismos y poder así estimar los probables/ loci y alelos implicados y las homologías entre estas poblaciones.

La determinación de los probables loci y alelos involucrados fue muy/ difícil y en ciertos casos sólo se han podido individualizar diferentes feno tipos. Esta dificultad es producto de la gran variación de número e intensidad de las bandas a lo largo del crecimiento de las plántulas.

Las bandas EST-1, EST-2, EST-3 y EST-4, no mostraron ninguna variación ya sea entre especies, individuos u órganos, aunque en epicótilo e hipocótilo presentaban una tinción algo más débil que en cotiledón. Las restantes bandas mostraron, en los 3 órganos mencionados patrones complejos de aparición que/ serán descritos más adelante.

Reacción de las diferentes isoenzimas frente a los diferentes sustratos: pro-  
bables loci y alelos.

Como se puede apreciar en la Tabla 81 las bandas EST-1, EST-2, //

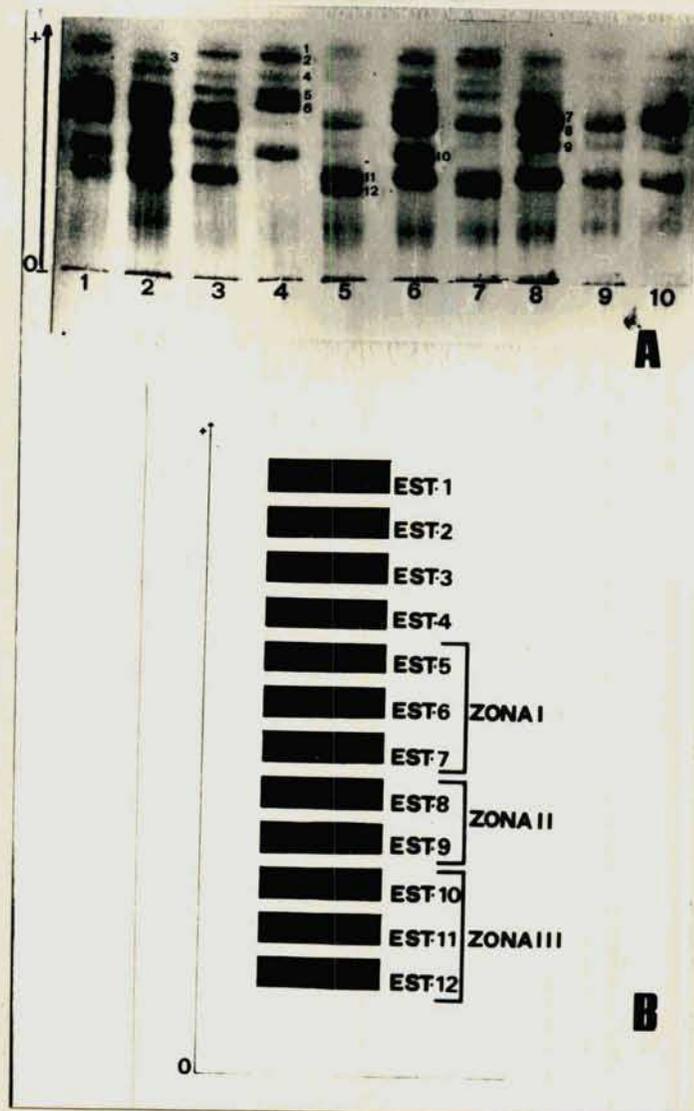


Figura 9. A) Zimograma de esterasas de individuos de especies de la Sección Strombocarpa: 1 y 2, *P. strombulifera* (9563); 3-5, *P. strombulifera* (19); 6-10, *P. reptans* (166). En el zimograma A), se indican los números de las bandas siguiendo la nomenclatura esquematizada en B). B) Esquema de las bandas observadas en los individuos de las especies analizadas.

Tabla 81. Comparación de la intensidad de tinción de las bandas con activación de esterasas en cotiledones, epicótilo e hipocótilo de 7 días, usando diferentes sustratos, en poblaciones de especies de la Sección Strombocarpa. Intensidad de tinción; +++ = intensa, ++ = media, + = tenue o ausente, --- = ausente. Sustratos:  $\alpha$ NA= acetato de  $\alpha$ -naftilo;  $\beta$ NA= acetato de  $\beta$ -naftilo;  $\alpha$ NP= propionato de  $\alpha$ -naftilo;  $\alpha$ NB= butirato de  $\alpha$ -naftilo;  $\alpha$ NS= estearato de  $\alpha$ -naftilo;  $\alpha$ NM= meristato de  $\alpha$ -naftilo. Especies: P. strombulifera y P. reptans.

O R G A N O S

BANDAS	COTILEDON						EPICOTILO						HIPOCOTILO						
	$\alpha$ NA	$\beta$ NA	$\alpha$ NP	$\alpha$ NB	$\alpha$ NS	$\alpha$ NM	$\alpha$ NA	$\beta$ NA	$\alpha$ NP	$\alpha$ NB	$\alpha$ NS	$\alpha$ NM	$\alpha$ NA	$\beta$ NA	$\alpha$ NP	$\alpha$ NB	$\alpha$ NS	$\alpha$ NM	
EST-1	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	---	---	---	---	---	---	---
EST-2	+++	++	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++	++	---	---	---	---	---	---
EST-3	++	+++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	---	---	---	---	---	---
EST-4	++	+++	++	++	++	++	/--	+++	+++	+++	+++	+++	/--	---	---	---	---	---	---
EST-5	+++	---	+++	+++	+++	---	++	---	---	---	---	---	++	---	---	---	---	---	---
EST-6	+++	---	+++	+++	+++	---	++	---	---	---	---	---	++	---	---	---	---	---	---
EST-7	+++	---	+++	+++	+++	---	++	---	---	---	---	---	++	---	---	---	---	---	---
EST-8	+++	---	+++	---	---	---	++	---	---	---	---	---	++	---	---	---	---	---	---
EST-9	+++	---	+++	---	---	---	++	---	---	---	---	---	++	---	---	---	---	---	---
EST-10	+++	---	+++	---	---	---	++	---	---	---	---	---	++	---	---	---	---	---	---
EST-11	+++	+++	+++	---	---	---	++	---	---	---	---	---	++	---	---	---	---	---	---
EST-12	+++	+++	+++	---	---	---	++	---	---	---	---	---	++	---	---	---	---	---	---

EST-3, y EST-4 reaccionan con  $\alpha$ NA,  $\beta$ NA,  $\alpha$ NP,  $\alpha$ NB,  $\alpha$ NS, y  $\alpha$ NM. La banda/ EST-1, sin embargo, tiene un comportamiento diferencial con respecto a las / otras tres, puesto que reaccionan con  $\alpha$ NS y  $\alpha$ NM mucho más intensamente que aquéllas. Esto estaría indicando que la banda monomórfica EST-1 estaría codi- ficada por un gen al cual se denominó Est-1, diferente al o a los que codifi- carían las bandas EST-2, EST-3 y EST-4.

Las bandas EST-1 y EST-2, ante una mezcla de  $\alpha$ NA y  $\beta$ NA dan un co- lor marrón, mientras que las bandas EST-3 y EST-4, reaccionan dando una fuer- te coloración roja. Esto demostraría mayor afinidad de EST-3 y EST-4 por  $\beta$ NA que la demostrada por las bandas EST-1 y EST-2. De esto se podría deducir que la banda EST-2 estaría codificada por un gen diferente al de las bandas EST- 3 y EST-4, y el locus correspondiente fue denominado Est-2.

Las bandas EST-3 y EST-4 en cotiledón, reaccionan frente a los dife- rentes sustratos de la misma manera en cuanto a presencia e intensidad; lo / mismo sucede en hipocótilo a pesar de que en general en este órgano la tin- ción es leve. Cuando se analizaron estas bandas en epicótilo usando como / sustrato  $\alpha$ NA ó  $\beta$ NA, EST-4 siempre aparecía mucho menos teñida que EST-3; es- to tal vez indicaría que cada una de estas isoenzimas está codificada por / dos genes distintos a los que se denominó Est-3 y Est-4.

Las restantes ocho bandas fueron agrupadas en tres zonas en base a/ su afinidad por los diferentes sustratos y por su movilidad. Dichas zonas // fueron denominadas EST-I, EST-II y EST-III, en orden decreciente de veloci- dad de migración relativa. En estas zonas no pudo establecerse el número de/ genes y alelos involucrados, debido a que existe mucha variación tanto en in- tensidad como en aparición y desaparición de las bandas, entre individuos de una misma población. Esto hace suponer que tal vez estén sujetos a complica- dos sistemas de regulación, lo que dificulta el análisis.

La primera zona incluiría las bandas EST-5, EST-6 y EST-7.

Esta zona reacciona tenuemente con  $\alpha$ NB y  $\alpha$ NS, intensamente con  $\alpha$ NA y  $\alpha$ NP y no lo hace con  $\beta$ NA ni con  $\alpha$ NM.

La zona II comprende las bandas EST-8, EST-9 y EST-10 que reaccionan intensamente con  $\alpha$ NA y  $\alpha$ NP, no haciéndolo con  $\beta$ NA,  $\alpha$ NB,  $\alpha$ NS ni  $\alpha$ NM. Finalmente la zona III que incluye las bandas EST-11 y EST-12, reacciona intensamente con  $\alpha$ NA y  $\alpha$ NP, tenuemente con  $\beta$ NA y no reacciona frente a los otros sustratos utilizados.

En las zonas I y II se pueden ver patrones que comprenden una a tres bandas, mientras que en la zona III se observan patrones de cero a dos bandas, apareciendo muchas veces sólo rastros o estelas de las mismas.

De lo descrito se puede resumir que existirían cuatro genes monomórficos (bandas EST-1 a EST-4) para las dos especies estudiadas y que las ocho bandas restantes (las cuales no fueron incluidas en los cálculos de distancias e identidad genética) agrupadas en tres zonas, presentaron una gran variación que no fue posible hasta el momento identificar con certeza.

PEROXIDASA E.C. 1.11.1.7. (PRX)

Selección de los órganos analizados

Para la interpretación del sistema isoenzimático de las peroxidases, se realizaron diversas pruebas utilizando diferentes órganos y diferentes períodos del desarrollo. Tales ensayos permitieron elegir aquel estadio y órgano de las plántulas donde se obtenía mejor resolución de las bandas,

Con el tampón utilizado (ver Materiales y Métodos), la actividad peroxidásica no se observó sino hasta 3 a 5 días después de iniciada la germinación.

La mejor resolución de las bandas fue obtenida en la primera hoja / adulta. Usando este órgano no se forman los "cometas" que dificultan la identificación de las bandas. Sin embargo, debido a que las plántulas no siempre alcanzaban a desarrollar la primera hoja adulta, fue necesario utilizar cotiledones de aproximadamente 7 días después del comienzo de la germinación. El patrón de bandas isoenzimáticas fue el mismo en cotiledón, epicótilo, hipocótilo y primera hoja adulta.

Sección Algarobia.

Todas las especies de esta Sección mostraron tres bandas de migración anódica, denominadas en orden decreciente de movilidad PRX-1, PRX-2 y PRX-3. Se observaron además algunas bandas que migraban muy próximas al frente de bromofenol y bandas catódicas que no fueron incluidas en el análisis debido a que no eran de aparición regular (Fig. 10 A, B y C)

Los patrones observados variaron entre individuos, poblaciones y es

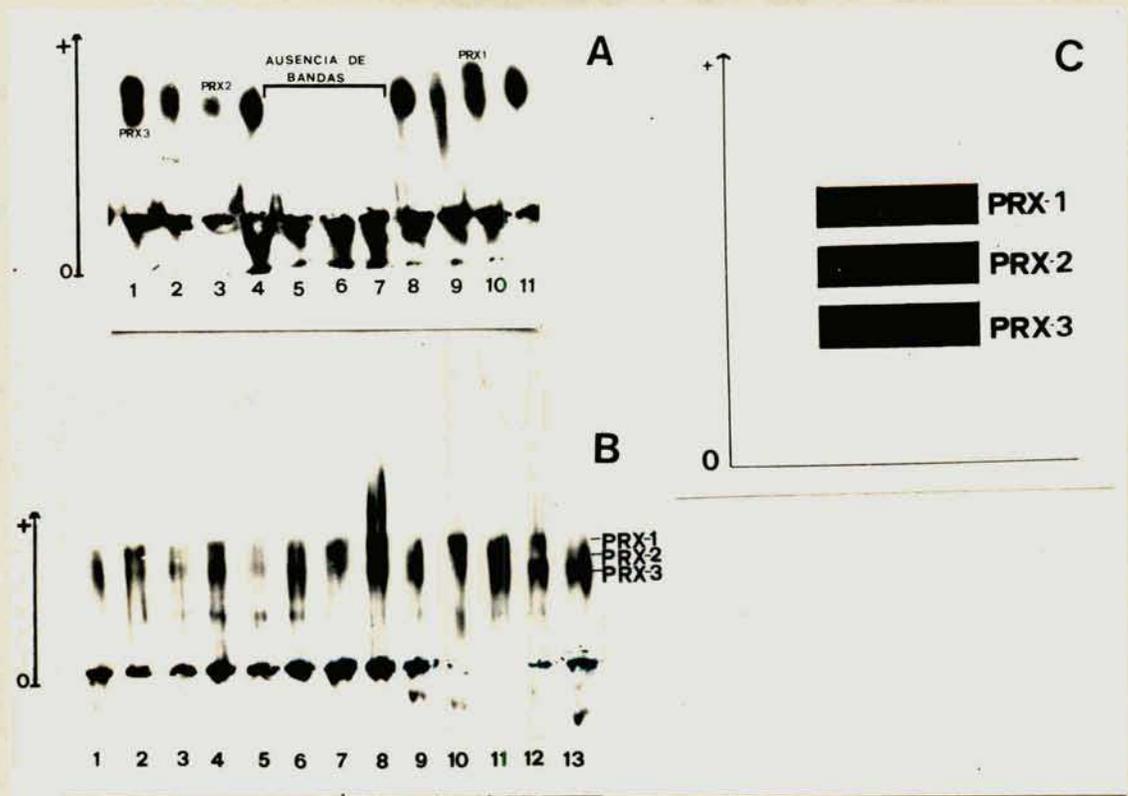


Figura 10. A y B) Zimogramas de peroxidasas de individuos de especies de la Sección Algarobia. A): 1-5, *P. nigra* (142, 143, 434, 435, 438); 6, *P. caldenia* (124); 7, *P. flexuosa* (133); 8-10, *P. ruscifolia* (332, 334, 770). B): 1 y 2, *P. ruscifolia* (149, 150); 3 y 4, *P. nigra* (141, 358); 5 y 6, *P. alba* (315, 323); 7 y 8, *P. hassleri* (311, 316); 9, *P. caldenia* (118); 10, *P. flexuosa* (132); 11-13, *P. alpataco* (109, 111, 112). C) Esquema de las bandas observadas en los individuos de las especies analizadas.

pecies,

En la población de P.ruscifolia de Avellaneda, todos los individuos presentaban las bandas PRX-2 y PRX-3, mientras que la banda PRX-1 se hallaba presente sólo en algunos individuos.

En P.ruscifolia de la provincia de Formosa, P.alba, P.hassleri y P.alpataco, PRX-3 pudo ser observada en todos los individuos, mientras que PRX-1 y PRX-2 podían estar presentes o ausentes. Finalmente P.nigra de Entre Ríos, P.nigra de Stgo. del Estero, P.caldenia y P.flexuosa, presentaron individuos de una, dos, tres o ninguna banda.

Cuando se analizaron las semillas provenientes de individuos de posible origen híbrido, no aparecieron patrones de bandas diferentes de aquellos encontrados en los posibles progenitores. Esto hace suponer la existencia de los mismos genes en todas estas especies.

#### Determinación de los posibles loci y alelos

En especies diploides, tales como las que fueron estudiadas en este trabajo, no puede haber en un individuo más de dos alelos por locus. Por lo tanto se esperarían patrones de 1 ó 2 bandas para enzimas monoméricas, 1 ó 3 para enzimas diméricas, 1 ó 5 para tetraméricas, etc.

Los patrones observados no se ajustan a las predicciones para enzimas poliméricas, y es más factible asociar su comportamiento al de una (s) / enzima (s) monomérica (s) con alelos nulos, que en homocigosis producirían / ausencia de enzima, explicando así la presencia de individuos sin bandas.

En P.ruscifolia de Formosa, P.alba, P.hassleri y P.alpataco, PRX-3 no presentó variación en ningún individuo, mientras que sí se observó variación en las bandas PRX-1 y PRX-2, por lo tanto PRX-3 no sería alternativa //

alélica de PRX-1 ni de PRX-2 y debería estar codificada por un locus diferente al o a los que codifican para las bandas PRX-1 y PRX-2. Se denominó entonces Prx-3 al gen que codifica la isoenzima PRX-3, cuyo locus presentaría dos alelos, uno activo ( $Prx-3^1$ ) y uno nulo ( $Prx-3^0$ ), presente en P.nigra, P.fleuxosa y P.caldenia que en homocigosis determinaría ausencia de banda.

Todos los individuos de P.ruscifolia de Avellaneda, presentaron las bandas PRX-2 y PRX-3, mientras que la banda PRX-1 mostró variación, estando presente en algunos individuos y ausente en otros. Por lo tanto se puede suponer que PRX-1 estaría codificada por un locus diferente al que codifica las bandas PRX-2 y PRX-3. De esta manera se denominó Prx-1 al gen que codificaría a la banda PRX-1 y Prx-2 al que codificaría para la banda PRX-2. Cada uno de ellos tendría un alelo nulo ( $Prx-1^0$ ,  $Prx-2^0$  respectivamente) y uno activo ( $Prx-1^1$  y  $Prx-2^1$ ).

Los dos alelos del locus Prx-1 están presentes en todas las poblaciones de las especies estudiadas de esta Sección. El alelo  $Prx-2^0$  sólo está ausente en P.ruscifolia de Avellaneda.

En base a esta hipótesis de tres genes cada uno de ellos con un alelo activo y otro nulo, se numeran a continuación los diferentes fenotipos observados (bandas) y los genotipos hipotéticos correspondientes:

LOCI PROPUESTOS	GENOTIPOS PROPUESTOS	BANDAS
Prx-1	$Prx-1^{1/1}$ y $Prx-1^{1/0}$ $Prx-1^{0/0}$	PRX-1 Ausencia de banda.
Prx-2	$Prx-2^{1/1}$ y $Prx-2^{1/0}$ $Prx-2^{0/0}$	PRX-2 Ausencia de banda
Prx-3	$Prx-3^{1/1}$ y $Prx-3^{1/0}$ $Prx-3^{0/0}$	PRX-3 Ausencia de banda

En las tablas 82 a 102 se dan las frecuencias fenotípicas de los // tres loci para las diferentes especies y poblaciones.

Las frecuencias alélicas se estimaron a partir de las fenotípicas suponiendo que las poblaciones estaban en equilibrio (Tabla 119).

### Sección Strombocarpa

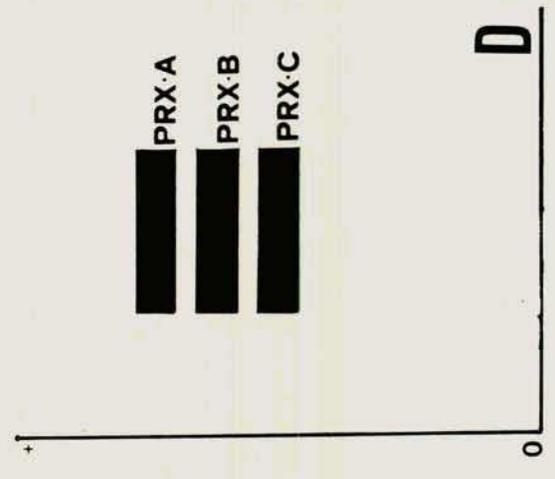
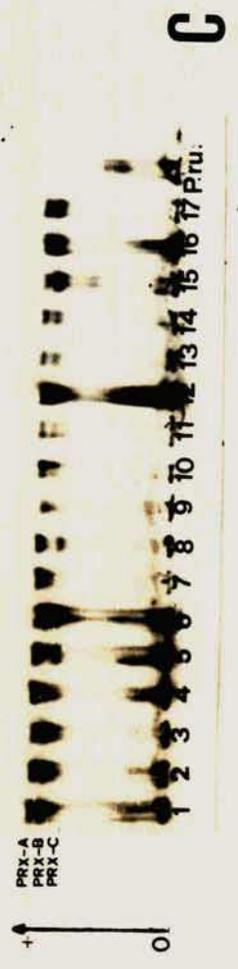
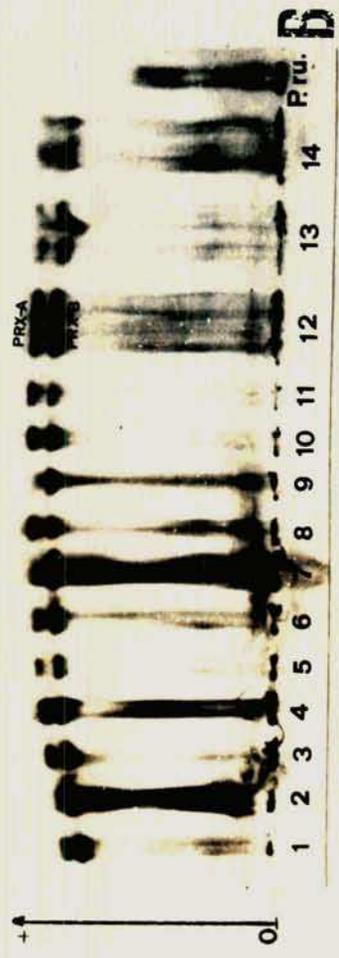
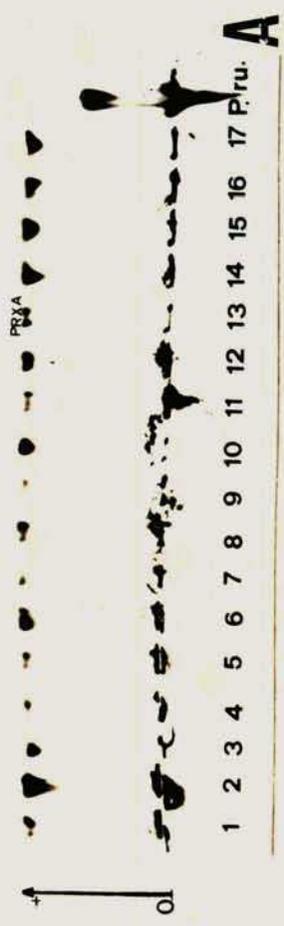
Las dos especies presentaron en común una banda monomórfica denominada PRX-A, de velocidad de migración anódica mucho mayor que la PRX-1 descrita en la Sección Algarobia (Fig. 11 A). Esta banda se colorea inmediatamente al tratar el gel con bencidina. Una segunda banda (PRX-B) de menor velocidad de migración que aparece luego de unos 10 minutos de iniciada la / coloración, se observó en todos los individuos de P.strombulífera y en algunos de P.reptans (Fig. 11 B y C). Finalmente una tercera banda PRX-C de menor velocidad de migración que PRX-B y que aparece simultáneamente con esta última, se halla presente solamente en algunos individuos de P.reptans (Fig./ 11 C). En esta última especie las bandas PRX-B y PRX-C presentaron los siguientes patrones de aparición en los diferentes individuos: PRX-B, PRX-C, / ambas bandas o ninguna.

### Determinación de los probables loci y alelos

La no aparición simultánea durante la coloración de la banda PRX-A/ con respecto a las bandas PRX-B y PRX-C señalaría que estas enzimas tendrían diferente afinidad por el sustrato y, por lo tanto, es probable que PRX-A / no sea un alozima de PRX-B y PRX-C.

De estos resultados puede suponerse que existirían dos loci, el pri

Figura 11. Zimogramas de peroxidasas de individuos de especies de la Sección Strombocarpa. A) Bandas peroxidásicas obtenidas inmediatamente después de iniciada la tinción, solamente se observa la banda PRX-A: 1-5, P.strombulifera (19); 6-10, P. strombulifera (9563); 11-17, P. reptans (166). P.ru= P.ruscifolia (710). B) Bandas peroxidásicas obtenidas luego de 10 minutos de iniciada la tinción; aparece la banda PRX-B: 1-7, P. strombulifera (9563); 8-14, P. strombulifera (19). P.ru= P.ruscifolia (710). C) Bandas peroxidásicas obtenidas luego de 10 minutos de iniciada la tinción; aparecen las bandas PRX-B y PRX-C: 1-17, P.reptans (166); P.ru= P.ruscifolia (710). D) Esquema de las bandas observadas en los individuos de las especies analizadas.



D

Tabla 82. Frecuencias fenotípicas absolutas observadas para el locus Prx-1 en P. ruscifolia (Formosa).

Genotipos Propuestos	Nº Observados
$\text{Prx-1}^{1/1} + \text{Prx-1}^{1/0}$	19
$\text{Prx-1}^{0/0}$	81

Tabla 83. Frecuencias fenotípicas absolutas observadas para el locus Prx-2 en P. ruscifolia (Formosa).

Genotipos Propuestos	Nº Observados
$\text{Prx-2}^{1/1} + \text{Prx-2}^{1/0}$	84
$\text{Prx-2}^{0/0}$	12

Tabla 84. Frecuencias fenotípicas absolutas observadas para el locus Prx-1 en P. ruscifolia (Avelhaneda).

Genotipos Propuestos	Nº Observados
$\text{Prx-1}^{1/1} + \text{Prx-1}^{1/0}$	1
$\text{Prx-1}^{0/0}$	21

Tabla 85. Frecuencias fenotípicas absolutas observadas para el locus Prx-1 en P. nigra (Sgo. del Estero).

Genotipos Propuestos	Nº Observados
$\text{Prx-1}^{1/1} + \text{Prx-1}^{1/0}$	13
$\text{Prx-1}^{0/0}$	72

Tabla 86. Frecuencias fenotípicas absolutas observadas para el locus Prx-2 en P. nigra (Sgo. del Estero).

Genotipos Propuestos	Nº Observados
$\text{Prx-2}^{1/1} + \text{Prx-2}^{1/0}$	79
$\text{Prx-2}^{0/0}$	9

Tabla 87. Frecuencias fenotípicas absolutas observadas para el locus Prx-3 en P. nigra (Sgo. del Estero).

<u>Genotipos Propuestos</u>	<u>NºObservados</u>
$\text{Prx-3}^{1/1} + \text{Prx-3}^{1/0}$	48
$\text{Prx-3}^{0/0}$	35

Tabla 88. Frecuencias fenotípicas absolutas observadas para el locus Prx-1 en P. nigra (Entre Ríos).

<u>Genotipos Propuestos</u>	<u>NºObservados</u>
$\text{Prx-1}^{1/1} + \text{Prx-3}^{1/0}$	28
$\text{Prx-1}^{0/0}$	62

Tabla 89. Frecuencias fenotípicas absolutas observadas para el locus Prx-2 en P. nigra (Entre Ríos).

<u>Genotipos Propuestos</u>	<u>NºObservados</u>
$\text{Prx-2}^{1/1} + \text{Prx-2}^{1/0}$	43
$\text{Prx-2}^{0/0}$	37

Tabla 90. Frecuencias fenotípicas absolutas observadas para el locus Prx-3 en P. nigra (Entre Ríos).

<u>Genotipos Propuestos</u>	<u>NºObservados</u>
$\text{Prx-3}^{1/1} + \text{Prx}^{1/0}$	60
$\text{Prx-3}^{0/0}$	20

Tabla 91. Frecuencias fenotípicas absolutas observadas para el locus Prx-1 en P. alba (Formosa).

<u>Genotipos Propuestos</u>	<u>NºObservados</u>
$\text{Prx-1}^{1/1} + \text{Prx-1}^{1/0}$	60
$\text{Prx-1}^{0/0}$	31

Tabla 92. Frecuencias fenotípicas absolutas observadas para el locus Prx-2 en P. alba (Formosa).

Genotipos Propuestos	Nº Observados
Prx-2 <sup>1/1</sup> + Prx-2 <sup>1/0</sup>	60
Prx-2 <sup>0/0</sup>	21

Tabla 93. Frecuencias fenotípicas absolutas observadas para el locus Prx-1 en P. hassleri (Formosa).

Genotipos Propuestos	Nº Observados
Prx-1 <sup>1/1</sup> + Prx-1 <sup>1/0</sup>	53
Prx-1 <sup>0/0</sup>	47

Tabla 94. Frecuencias fenotípicas absolutas observadas para el locus Prx-2 en P. hassleri (Formosa).

Genotipos Propuestos	Nº Observados
Prx-2 <sup>1/1</sup> + Prx-2 <sup>1/0</sup>	73
Prx-2 <sup>0/0</sup>	16

Tabla 95. Frecuencias fenotípicas absolutas observadas para el locus Prx-1 en P. alpataco (Chacharramendi).

Genotipos Propuestos	Nº Observados
Prx-1 <sup>1/1</sup> + Prx-1 <sup>1/0</sup>	77
Prx-1 <sup>0/0</sup>	10

Tabla 96. Frecuencias fenotípicas absolutas observadas para el locus Prx-2 en P. alpataco (Chacharramendi).

Genotipos Propuestos	Nº Observados
Prx-2 <sup>1/1</sup> + Prx-2 <sup>1/0</sup>	35
Prx-2 <sup>0/0</sup>	45

Tabla 97. Frecuencias fenotípicas absolutas observadas para el locus Prx-1 en P. flexuosa (Cura-Có).

Genotipos Propuestos	Nº Observados
Prx-1 <sup>1/1</sup> + Prx-1 <sup>1/0</sup>	42
Prx-1 <sup>0/0</sup>	48

Tabla 98. Frecuencias fenotípicas absolutas observadas para el locus Prx-2 en P. flexuosa (Cura-Có).

Genotipos Propuestos	Nº Observados
Prx-2 <sup>1/1</sup> + Prx-2 <sup>1/0</sup>	43
Prx-2 <sup>0/0</sup>	55

Tabla 99. Frecuencias fenotípicas absolutas observadas para el locus Prx-3 en P. flexuosa (Cura-Có).

Genotipos Propuestos	Nº Observados
Prx-3 <sup>1/1</sup> + Prx-3 <sup>1/0</sup>	69
Prx-3 <sup>0/0</sup>	27

Tabla 100. Frecuencias fenotípicas absolutas observadas para el locus Prx-1 en P. caldenia (Santa Rosa).

Genotipos Propuestos	Nº Observados
Prx-1 <sup>1/1</sup> + Prx-1 <sup>1/0</sup>	55
Prx-1 <sup>0/0</sup>	33

Tabla 101. Frecuencias fenotípicas absolutas observadas para el locus Prx-2 en P. caldenia (Santa Rosa).

Genotipos Propuestos	Nº Observados
Prx-2 <sup>1/1</sup> + Prx-2 <sup>1/0</sup>	58
Prx-2 <sup>0/0</sup>	31

Tabla 102. Frecuencias fenotípicas absolutas observadas para el locus Prx-3 en P. caldenia ( Santa Rosa).

Genotipos Propuestos	Nº Observados
Prx-3 <sup>1/1</sup> + Prx-3 <sup>1/0</sup>	61
Prx-3 <sup>0/0</sup>	28

Tabla 103. Comparación de las frecuencias genotípicas absolutas observadas y esperadas para el locus Prx-B en P. reptans ( Sgo. del Estero).

Genotipos Propuestos	Nº Observados	Nº Esperados
Prx-B <sup>1/1</sup> + Prx-B <sup>1/0</sup>	28	27.97
Prx-B <sup>2/2</sup> + Prx-B <sup>2/0</sup>	9	7.15
Prx-B <sup>0/0</sup>	10	10.01
Prx-B <sup>1/2</sup>	4	5.87

$$\chi^2_1 = 1.07 ; p = 0.30$$

mero que codificaría para la isoenzima PRX-A (de rápida aparición y el segundo, de aparición retardada, que codificaría para las dos isoenzimas. El // primer locus, monomórfico en ambas especies se denominó Prx-A. El segundo, Prx-B, sería monomórfico en P. strombulifera, produciendo la banda PRX-B y poli- / mórfico en P. reptans, produciendo las bandas PRX-B, PRX-C ambas o ninguna. De las combinaciones observadas para las alozimas PRX-B y PRX-C, el locus PRX-B / presentaría tres alelos, los que fueron denominados Prx-B<sup>1</sup>, Prx-B<sup>2</sup> y Prx-B<sup>0</sup>. / Este último, en homocigosis no produciría banda.

Alternativamente podría suponerse que PRX-B y PRX-C están codifica- / das por loci distintos, cada uno con un alelo activo y otro nulo. No obstante, se optó por la primera hipótesis porque: i) Considerando el punto (c) de Méto- dos utilizados para la determinación de los probables loci y alelos, ambas // bandas aparecen simultáneamente en todos los órganos estudiados (cotiledón, / epicótilo e hipocótilo) a partir del tercer día después de iniciada la germi- nación. Este hecho podría indicar que ambas isoenzimas (PRX-B y PRX-C) están / sujetas al mismo sistema de regulación y tal vez estén codificadas por alelos de un locus. ii) Se calcularon las frecuencias génicas (Tabla 120) para el lo- cus PRX-B con sus probables tres alelos, Prx-B<sup>1</sup>, Prx-B<sup>2</sup> y Prx-B<sup>0</sup> y posterior- mente por medio de una prueba  $\chi^2$  se determinó que las frecuencias genotípicas observadas no se apartaban de las esperadas para un equilibrio de Hardy- Weinberg (Tabla 103) ( $p > 0.05$ ). Esto reforzaría la hipótesis de que las bandas / PRX-B y PRX-C serían productos de alelos de un gen.

De acuerdo con lo propuesto se indican a continuación los diferentes fenotipos observados (Bandas) y los correspondientes genotipos postulados:

LOCI PROPUESTOS	GENOTIPOS PROPUESTOS	BANDAS
Prx-A	Prx-A <sup>1/1</sup>	PRX-A

LOCI PROPUESTOS	GENOTIPOS PROPUESTOS	BANDAS
Prx-B	$Prx-B^{1/1}$ ó $Prx-B^{1/0}$	PRX-B
	$Prx-B^{2/2}$ ó $Prx-B^{2/0}$	PRX-C
	$Prx_B^{0/0}$	Ausencia de banda.
	$Prx_B^{1/2}$	PRX-C-B

6-FOSFOGLUCONATO DEHIDROGENASA E.C. 1,1,1,43. (6-PGD)

Selección de los órganos analizados.

Este sistema isoenzimático presentó muchas dificultades para poder// individualizar claramente las distintas bandas.

Fueron utilizadas semillas a 24 hs. de la iniciación de la germinación, cotiledón, epicótilo e hipocótilo con 4,7 y más días de crecimiento de la plántula, así como diferentes soportes y tampones. Finalmente, el estudio de 6-PGD fue realizado en semillas con 24 hs. de germinación.

Sección Algarobía

Dentro de esta Sección pudieron identificarse cuatro bandas anódicas denominadas 6PGD-1, 6PGD-2, 6PGD-3 y 6PGD-4, numeradas en orden decreciente de velocidad de migración electroforética.

La banda 6-PGD-3 es común a todas las especies de esta Sección y es la única en P.hassleri y P.alba (Fig. 12 A, muestras 7 y 8; C, muestras 2 y 3), la banda 6PGD-1 se observa en P.nigra, P.flexuosa y P.alpataco (Fig. 12/ A, muestras 9 y 10; B, muestra 2; C, muestra 1), la banda 6PGD-4 es característica de P.caldenia (Fig. 12 A, muestras 11-16) y la banda 6PGD-2 de P.ruscifolia (Fig. 12 A, muestras 1 - 6). En la figura 13 se esquematizan los zimogramas característicos de las especies estudiadas.

Cuando se analizaron individuos provenientes de árboles híbridos entre P.alba x P.hassleri, sólo se obtuvieron individuos con la banda 6PGD-3,

En el caso de individuos provenientes de árboles de P.hassleri x// P.ruscifolia se observaron las bandas 6PGD-2 y 6PGD-3 y a veces una banda intermedia entre ellas, muy tenue y poco constante como para poder ser inclu-

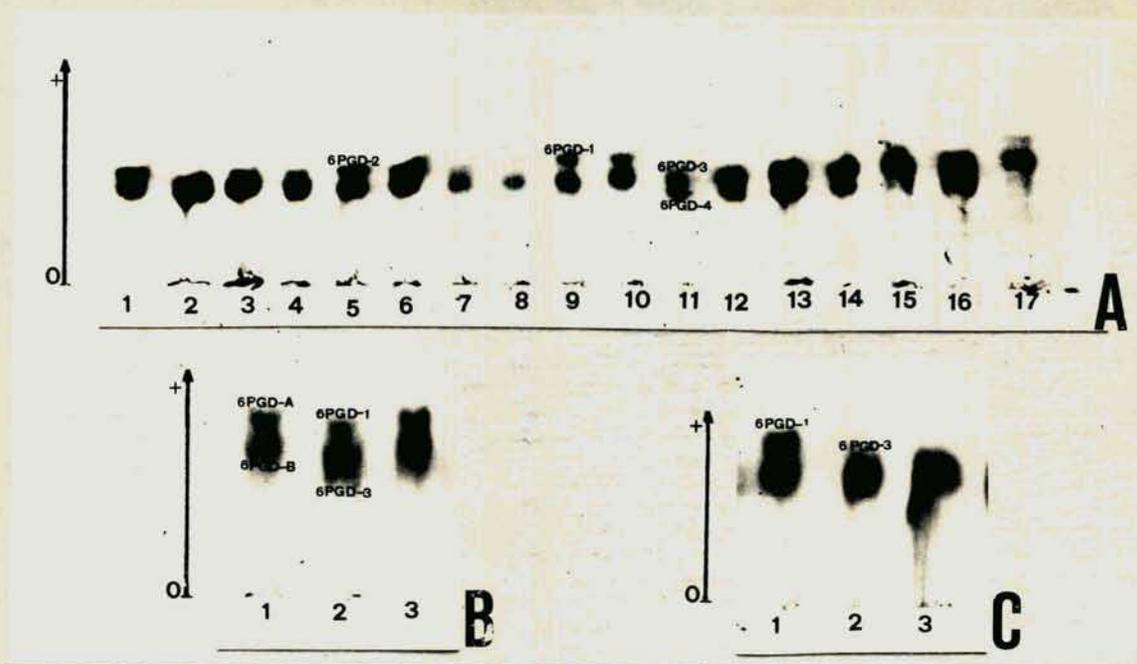


Figura 12. Zimogramas de 6-fosfogluconato dehidrogenasa de individuos de especies de las Secciones Algarobia y Strombocarpa. A) 1-6, *P. ruscifolia* (307,313,321,526,146,147); 7, *P. alba* (323); 8, *P. hassleri* (320); 9, *P. flexuosa* (133); 10, *P. alpáta* (111); 11-16, *P. caldenia* (123,124,126,118,119,120); 17, *P. flexuosa* (105), árbol muy cercano a *P. caldenia* (104). B) 1, *P. strombulifera* (19); 2, *P. nigra* (141); 3, *P. reptans* (166) C) 1, *P. nigra* (358); 2, *P. alba* (329); 3, *P. hassleri* (311).

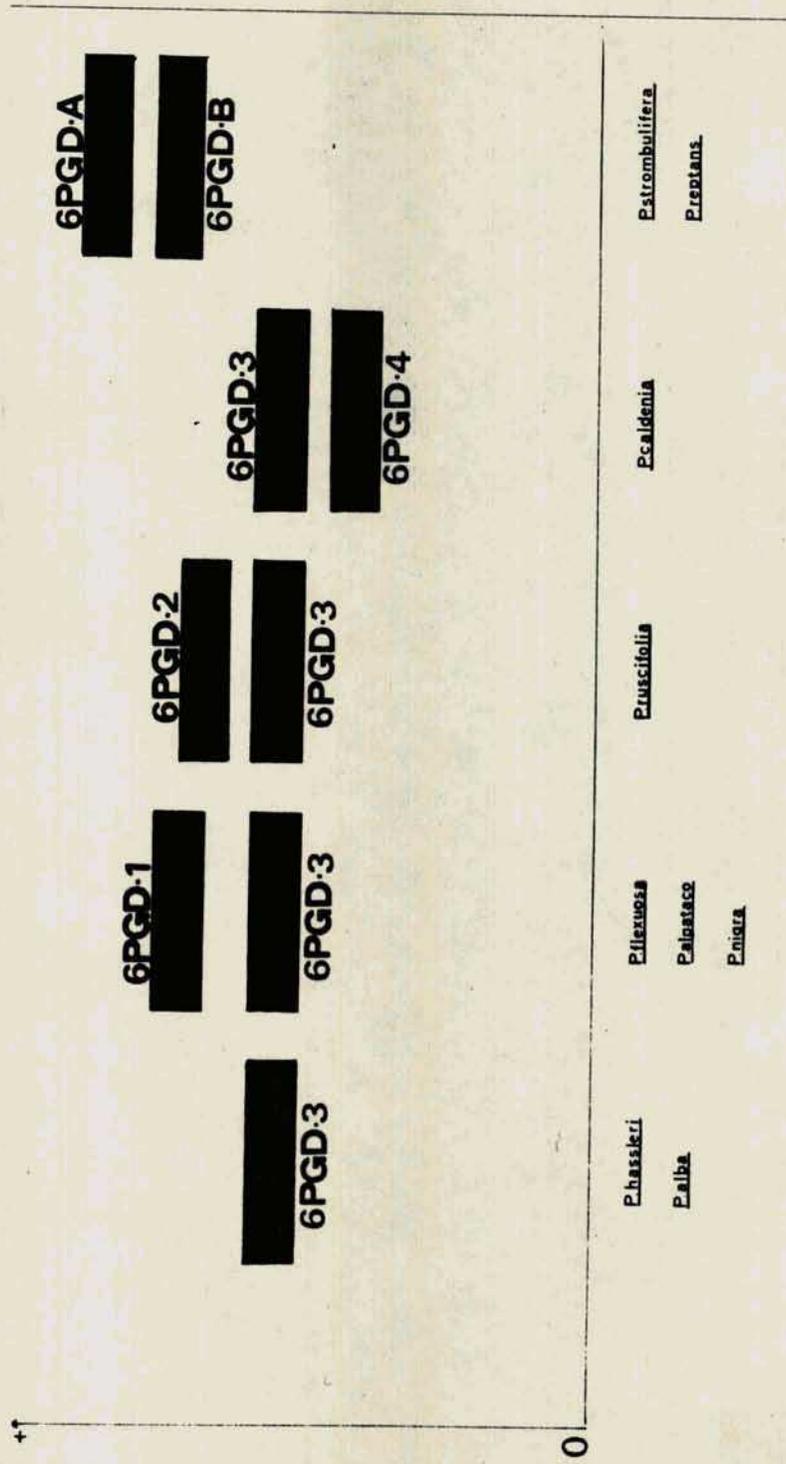


Figura 13. Esquema indicando los diferentes fenotipos observados en las especies de la Sección Algarobia y Strombocarpa para el sistema isoenzimático de 6-fosfogluconato dehidrogenasa.

ida en este análisis, Al analizar semillas provenientes de P.nigra x P.hassleri se observaron las bandas 6PGD-1 y 6PGD-3, siendo la primera muy tenue.

Estudiando individuos provenientes de árboles híbridos P.flexuosa x/ P.alpataco, se obtuvieron solamente individuos con las bandas características de las especies puras o sea 6PGD-1 y 6PGD-3. Finalmente, semillas provenientes de P.alpataco (171,172) y P.flexuosa (100, 103, 105, 106, 107) de enjambres híbridos y muy cercanos a árboles de P.caldenia, mostraron las bandas / 6PGD-1, 6PGD-3 y 6PGD-4 (Fig. 12 A, muestra 17) siendo 6PGD-1 y 6PGD-4 muy tenues.

#### Determinación de los probables loci y alelos

Debido a que no fue observado un polimorfismo aparente en las bandas descritas para las diferentes especies, y que en los individuos provenientes de los posibles híbridos o introgresantes no se observó segregación, sino solamente una adición de las bandas características de los posibles progenitores, se supuso que estarían implicados genes diferentes en la producción de cada isoenzima observada.

Esta hipótesis es apoyada por el hecho que cuando se analizaron las semillas provenientes de P.alpataco y P.flexuosa de enjambres híbridos, que muy probablemente sean resultado de hibridación con P.caldenia, aparecen simultáneamente individuos con las tres bandas (6PGD-1, 6PGD-3 y 6PGD-4). Dado que las especies son diplóides y no espera más que dos alelos por locus, es de suponer que estas tres bandas estarían codificadas por más de un gen./ En base a esto se denominó 6Pgd-1, 6Pgd-3 y 6Pgd-4 a los genes que codifican para las bandas 6PGD-1, 6PGD-3 y 6PGD-4 respectivamente.

Cuando se analizaron las semillas provenientes de árboles híbridos / P.hassleri x P.ruscifolia, sólo se observaron individuos con dos bandas .Nue

vamente, la no aparición de individuos poseyendo una sola de ellas haría /// descartar la posibilidad que estas dos bandas sean alélicas. Por lo tanto se denominó locus 6Pgd-2 a aquél que codifica para la banda 6PGD-2.

En base a esta hipótesis se dan a continuación el nombre de los/ posibles loci y bandas que ellos codificarían:

<u>LOCI PROPUESTOS</u>	<u>BANDAS</u>
6Pgd-1	6PGD-1
6Pgd-2	6PGD-2
6Pgd-3	6PGD-3
6Pgd-4	6PGD-4

#### Sección Strombocarpa

Todos los individuos de las poblaciones de las diferentes especies / analizadas mostraron un único patron de dos bandas.

Estas fueron denominadas en orden decreciente de velocidad de migra- ción electroforética, 6PGD-A y 6PGD-B, (Fig. 12 B, muestras 1 y 3; Fig .13).

Dado que no se dispuso de individuos de origen híbrido para su aná- lisis, y el estudio de diferentes estadios del desarrollo y órganos no dió / ninguna información adicional, se supuso un esquema para la producción de / las isoenzimas semejante al encontrado en las especies de la Sección Algaro- bia. Por lo tanto, se postuló que cada banda estaría codificada por un gen/ diferente, los que fueron denominados 6Pgd-A y 6Pgd-B respectivamente para// las isoenzimas 6PGD-A y 6PGD-B.

AMINOPEPTIDASA E.C. 3,4,1,2. (AMP)

Selección de los órganos analizados

Las mismas bandas fueron encontradas en semillas de 24 hs. de inicia da la germinación, y cotiledones, epicótilo e hipocótilo de plántulas de /// aproximadamente 7 días. La única diferencia observada fue que la intensidad/ de las bandas era menor en semillas de 24 hs. que en las plántulas de 7 /// días. Para este estudio isoenzimático se escogieron plántulas de este último estadio.

Sección Algarobia.

La especie que presentó mayor número de Isoenzimas fue P.caldenia, que mostró 5 bandas anódicas que fueron denominadas de mayor a menor velocidad / de migración electroforética AMP-1, AMP-2, AMP-3, AMP-4 y AMP-5 (Fig. 14 A y C). Las poblaciones de las otras especies analizadas en esta sección sólo / mostraron las bandas AMP-1, AMP-3, AMP-4 y AMP-5 (Fig. 14 B y C).

La banda AMP-1 era invariable y migraba muy cercanamente al frente / de bromo fenol. La banda AMP-2 estaba presente en todos los individuos de // P.caldenia. Con respecto a las otras 3 bandas, los patrones observados en todas / las especies podían presentar sólo 1 ó 2 de ellas por individuo: AMP-3, AMP-4, AMP-5, AMP-3 y AMP-4, AMP-3 y AMP-5 ó AMP-4 y AMP-5.

Al estudiar los individuos de posible origen híbrido (Ver Materiales y Métodos) sólo se pudo observar patrones semejantes a los de las especies / puras.

En los casos en que los individuos analizados provenían de cruzamien- tos en los cuales intervenía como un posible progenitor P.caldenia, la banda

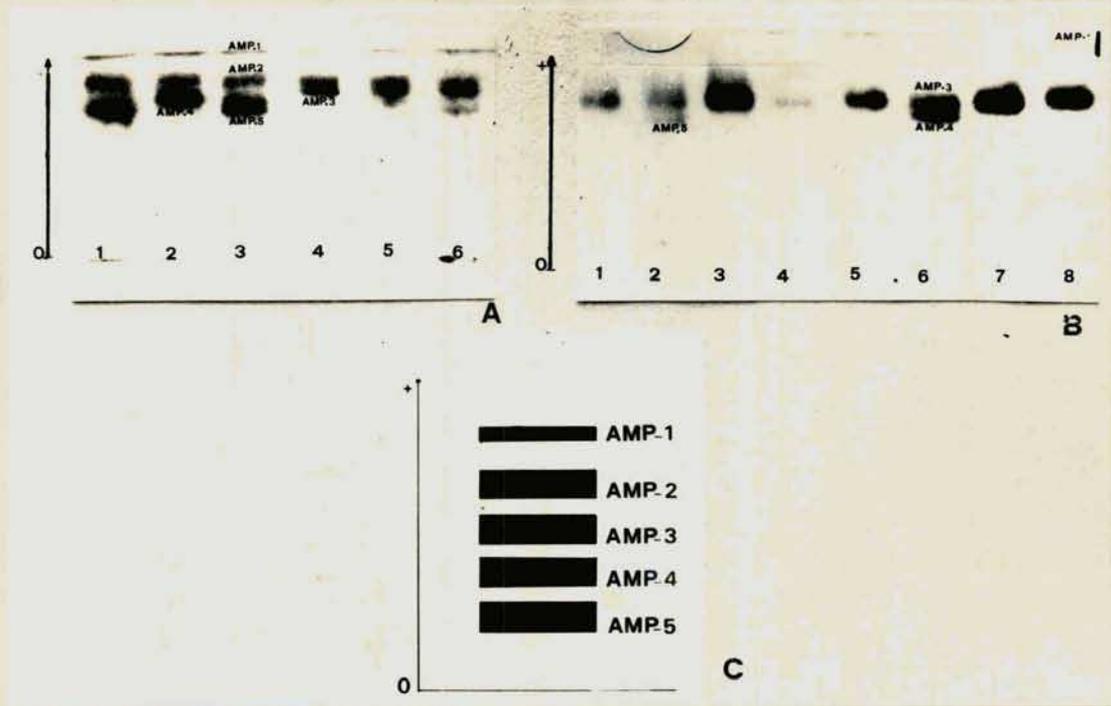


Figura 14. A y B). Zimogramas de aminopeptidasas de individuos de especies de la Sección Algarobia. A): 1-6, *P. caldenia* (118, 119, 120, 121, 123 y 124) B): 1 y 2, *P. ruscifolia* (321, 151); 3 y 4, *P. nigra* (139, 358); 5, *P. alba* (329); 6, *P. hassleri* (311); 7, *P. alpataco* (112); 8, *P. flexuosa* (132). C) Esquema de las bandas observadas en los individuos de las especies analizadas.

AMP-2 se hallaba presente con intensidad de coloración variable y en algunos individuos prácticamente no era posible identificarla.

### Determinación de los posibles loci y alelos

Como en los patrones isoenzimáticos de los posibles individuos de origen híbrido se aprecia la ausencia de combinaciones diferentes a las encontradas en los presuntos padres, se supone que al menos existe homología para las bandas AMP-1, AMP-3, AMP-4 y AMP-5 entre las diferentes especies.

Para la determinación de loci y alelos se utilizaron diferentes sustratos, como fue explicado previamente en Materiales y Métodos.

En las tablas 104, 105 y 106 se observan los resultados obtenidos en plántulas de 7 días, utilizando los diferentes sustratos. Con el objeto de simplificar la escritura, se denominará con A, al sustrato clorhidrato de p-nitroanilida de N- $\alpha$ -benzoil-DL-arginina, con B, al clorhidrato de  $\beta$ -naftilamida 4 metoxi-L-leucina, con C, al clorhidrato de  $\beta$ -naftilamida de N- $\alpha$ -benzoil-DL-arginina, con D, al clorhidrato de  $\beta$ -naftilamida de L-leucina. Como se aprecia en las tablas 104, 105 y 106 AMP-1 comprendería en realidad al menos dos enzimas con igual velocidad de migración. Esto surge del hecho que dicha banda en P.flexuosa, P.alpataco y P.caldenia (Tablas 104 y 105) // reacciona con los 4 sustratos mientras que en el resto de las especies (Tabla 106) sólo lo hace con B y D. Como estos últimos son sustratos para endopeptidasas, mientras que A y C los son para exopeptidasas, podría suponerse // que todas las especies presentarían un locus (AMP-1) que codificaría una endopeptidasa que daría la banda AMP-1. Por otra parte, P.alpataco, P.flexuosa y P.caldenia poseerían un segundo locus (AMP-2), que codificaría para una // exopeptidasa que reaccionaría con A y C, cuya velocidad de migración sería /

Tabla 104. Comparación de la intensidad de tinción de las bandas con actividad amonopeptidasa en cotiledón, epicótilo e hipocótilo de 7 días, usando diferentes sustratos, en la especie P. caldenia de la Sección Algarobia. Intensidad de tinción: +++= intensa, ++= media, += tenue, /-= tenue o ausente, ---= ausente. Sustratos: (A)= clorhidrato de p- nitroanilida de N-  $\alpha$ -benzoil- DL-arginina, (B)= clorhidrato de  $\beta$ naftilamida de 4- metoxi-L- leucina, (C)= clorhidrato de  $\beta$ naftilamida de N-  $\alpha$ - benzoil-DL- arginina, (D)= clorhidrato de  $\beta$ -naftilamida de L- leucina.

BANDAS	O R G A N O S											
	COTILEDON				EPICOTILO				HIPOCOTILO			
	(A)	(B)	(C)	(D)	(A)	(B)	(C)	(D)	(A)	(B)	(C)	(D)
AMP-1	+++	+++	+++	+++	++-	++-	++-	++-	+-	+-	+-	+-
AMP-2	---	+++	---	+++	---	++	---	++	---	+-	---	+-
AMP-3	/--	+++	/--	+++	---	++	---	++	---	+-	---	+-
AMP-4	/--	+++	/--	+++	---	++	---	++	---	+-	---	+-
AMP-5	/--	+++	/--	+++	---	++	---	++	---	+-	---	+-

Tabla 105. Comparación de la intensidad de tinción de las bandas con actividad aminopeptidasa en cotiledón epicótilo e hipocótilo de 7 días, usando diferentes sustratos, en poblaciones de especies de la Sección Algarobia. Intensidad de tinción: +++= intensa, ++= media, +== tenue, /== tenue o ausente, ---= ausente. Sustratos: (A)= clorhidrato de p-nitranilida de N- $\alpha$ -benzoil-DL-arginina, (B)= clorhidrato de  $\beta$ -naftilamida de 4-metoxi-L-leucina, (C)= clorhidrato de  $\beta$ -naftilamide de N- $\alpha$ -benzoil-DL-arginina, (D)= clorhidrato de  $\beta$ -naftilamida de L-leucina. Especies: P. alpataco y P. flexuosa.

BANDAS	O R G A N O S											
	COTILEDON				EPICOTILO				HIPOCOTILO			
	(A)	(B)	(C)	(D)	(A)	(B)	(C)	(D)	(A)	(B)	(C)	(D)
AMP-1	+++	+++	+++	+++	++	++	++	++	+++	+++	+++	+++
AMP-3	/---	+++	/---	+++	---	++	---	++	---	---	---	---
AMP-4	/---	+++	/---	+++	---	++	---	++	---	---	---	---
AMP-5	/---	+++	/---	+++	---	++	---	++	---	---	---	---

Tabla 106. Comparación de la intensidad de tinción de las bandas con actividad aminopeptidasa en cotiledón, epicótilo e hipocótilo de 7 días, usando diferentes sustratos, en poblaciones de especies de la Sección Algarobia. Intensidad de tinción: +++= intensa, ++= media, +== tenue, /== tenue o ausente, ---= ausente. Sustratos: (A)= clorhidrato de p-nitroanilida de N- $\alpha$ -benzoiL- DL- arginina, (B)= clorhidrato de  $\beta$ naftilamida de 4- metoxi- L- leucina, (C)= clorhidrato de  $\beta$ naftilamida de N- $\alpha$ - benzoiL- DL- arginina, (D)= clorhidrato de  $\beta$ -naftilamida de L- leucina. Especies: P. ruscifolia, P. nigra, P. alba y P. hassleri.

BANDAS	O R G A N O S											
	COTILEDON				EPICOTILO				HIPOCOTILO			
	(A)	(B)	(C)	(D)	(A)	(B)	(C)	(D)	(A)	(B)	(C)	(D)
AMP-1	-	+++	-	+++	-	++	-	++	-	+	-	+
AMP-3	/	+++	/	+++	-	++	-	++	-	+	-	+
AMP-4	/	+++	/	+++	-	++	-	++	-	+	-	+
AMP-5	/	+++	/	+++	-	++	-	++	-	+	-	+

igual a la de AMP-1, Dicha banda fue denominada AMP-A,

En resumen, con estos resultados se postuló la existencia de un gen/monomórfico común a todas las especies denominado Amp-1 que produce la isoenzima AMP-1 y otro locus también monomórfico denominado Amp-2 presente solamente en P.caldenia, P.flexuosa y P.alpataco, y que produce otra banda con la misma velocidad de migración que AMP-1 y a la que se denominó AMP-A.

La banda AMP-2 presente sólo en P.caldenia (Tabla 104) reacciona con los sustratos B y D. Esta enzima también estaría codificada por un gen monomórfico al que se denominó Amp-3.

Las bandas AMP-3, AMP-4 y AMP-5, reaccionan de igual forma en todas las especies. Con A y C lo hacen muy levemente, mientras que reaccionan intensamente con B y D (Tablas 104, 105 y 106).

De acuerdo a esto último, y dadas las combinaciones con que aparecen estas bandas, se postuló la existencia de un locus al que se denominó Amp-4/ con tres alelos codominantes denominados Amp-4<sup>1</sup>, Amp-4<sup>2</sup> y Amp-4<sup>3</sup>.

En base a los resultados obtenidos y a los loci postulados en la producción de estas aminopeptidasas, se dan a continuación los diferentes fenotipos observados y los genotipos correspondientes:

LOCI PROPUESTOS	GENOTIPOS PROPUESTOS	BANDAS
Amp-1	Amp-1 <sup>1/1</sup>	AMP-1
Amp-2	Amp-2 <sup>1/1</sup>	AMP-A
Amp-3	Amp-3 <sup>1/1</sup>	AMP-2
Amp-4	Amp-4 <sup>1/1</sup>	AMP-3
	Amp-4 <sup>2/2</sup>	AMP-4
	Amp-4 <sup>3/3</sup>	AMP-5
	Amp-4 <sup>1/2</sup>	AMP-3 y 4

Amp-4<sup>1/3</sup>

AMP-3 y 5

Amp-4<sup>2/3</sup>

AMP-4 y 5

---

A partir de las frecuencias observadas de los genotipos postulados // (Tablas 107-115) se calcularon las frecuencias alélicas para el locus polimórfico Amp-4 (Tabla 119). A partir de estas últimas se calcularon las frecuencias genotípicas esperadas para las condiciones de equilibrio según Hardy-Weinberg, comparándolas con las frecuencias observadas mediante la prueba //  $\chi^2$  (Tablas 107 - 115). Solamente en P.caldenia el estadístico fue significativo ( $0.01 < p < 0.05$ ) (Tabla 115).

#### Sección Strombocarpa

En los individuos analizados de P.reptans y P.strombulífera de Catamarca se individualizaron un total de 3 bandas anódicas, denominadas en orden decreciente de velocidad de migración electroforética AMP-A, AMP-B y AMP-C / (Fig. 15 A y B). La población de Rfo Negro de P.strombulífera solamente mostró las bandas AMP-A y AMP-C.

Las velocidades de migración de todas estas bandas fueron superiores a las encontradas en la Sección Algarobia y por lo tanto no es posible homologarlas.

La banda AMP-A está presente en todos los individuos de las poblaciones estudiadas de las 2 especies. AMP-B y AMP-C variaban en P.reptans y // P.strombulífera de Catamarca encontrándose distintos patrones de 1 ó 2 bandas: AMP-B, AMP-C ó AMP-B y AMP-C. La banda AMP-B estaba ausente en la población de Rfo Negro de P.strombulífera, donde todos los individuos presentaban la / banda AMP-C.

Tabla 107. Comparación de las frecuencias genotípicas absolutas observadas y esperadas para el locus Amp-4 en P. ruscifolia (Formosa).

Genotipos Propuestos	NºObservados	NºEsperados
Amp-4 <sup>1/1</sup>	0	1.32
Amp-4 <sup>1/2</sup>	21	16.22
Amp-4 <sup>1/3</sup>	2	4.14
Amp-4 <sup>2/2</sup>	45	49.70
Amp-4 <sup>2/3</sup>	30	25.38
Amp-4 <sup>3/3</sup>	2	3.24

$\chi^2_2 = 3.53; p = 0.17$

Tabla 108. Comparación de las frecuencias genotípicas absolutas observadas y esperadas para el locus Amp-4 en P. ruscifolia (Avellaneda).

Genotipos Propuestos	NºObservados	NºEsperados
Amp-4 <sup>1/1</sup>	0	0.72
Amp-4 <sup>1/2</sup>	17	12.16
Amp-4 <sup>1/3</sup>	0	3.40
Amp-4 <sup>2/2</sup>	46	51.12
Amp-4 <sup>2/3</sup>	34	28.60
Amp-4 <sup>3/3</sup>	3	4.00

$\chi^2_1 = 1.81; p = 0.18$

Tabla 109. Comparación de las frecuencias genotípicas absolutas observadas y esperadas para el locus Amp-4 en P. nigra (Sgo. del Estero).

Genotipos Propuestos	NºObservados	NºEsperados
Amp-4 <sup>1/1</sup>	6	3.50
Amp-4 <sup>1/2</sup>	10	13.50
Amp-4 <sup>1/3</sup>	6	7.50
Amp-4 <sup>2/2</sup>	12	13.00
Amp-4 <sup>2/3</sup>	20	14.47
Amp-4 <sup>3/3</sup>	2	4.02

$\chi^2_3 = 6.19; p = 0.10$

Tabla 110. Comparación de las frecuencias genotípicas absolutas observadas y esperadas para el locus Amp-4 en P. nigra (Entre Ríos).

Genotipos Propuestos	NºObservados	NºEsperados
Amp-4 <sup>1/1</sup>	11	7.14
Amp-4 <sup>1/2</sup>	13	15.51
Amp-4 <sup>1/3</sup>	9	14.27
Amp-4 <sup>2/2</sup>	11	8.43
Amp-4 <sup>2/3</sup>	13	15.51
Amp-4 <sup>3/3</sup>	11	7.14

$\chi^2_3 = 7.73; p = 0.05$

Tabla 111. Comparación de las frecuencias genotípicas absolutas observadas y esperadas para el locus Amp-4 en P. alba (Formosa).

Genotipos Propuestos	Nº Observados	Nº Esperados
Amp-4 <sup>1/1</sup>	6	5.45
Amp-4 <sup>1/2</sup>	24	23.82
Amp-4 <sup>1/3</sup>	1	2.33
Amp-4 <sup>2/2</sup>	26	26.05
Amp-4 <sup>2/3</sup>	5	5.10
Amp-4 <sup>3/3</sup>	1	0.25

$\chi^2_3 = 3.07; p = 0.38$

Tabla 112. Comparación de las frecuencias genotípicas absolutas observadas y esperadas para el locus Amp-4 en P. hassleri (Formosa).

Genotipos Propuestos	Nº Observados	Nº Esperados
Amp-4 <sup>1/1</sup>	4	3.70
Amp-4 <sup>1/2</sup>	23	23.64
Amp-4 <sup>1/3</sup>	4	3.99
Amp-4 <sup>2/2</sup>	39	37.82
Amp-4 <sup>2/3</sup>	11	12.77
Amp-4 <sup>3/3</sup>	2	1.08

$\chi^2_3 = 1.11; p = 0.77$

Tabla 113. Comparación de las frecuencias genotípicas absolutas observadas y esperadas para el locus Amp-4 en P. flexuosa (Cura-Có).

<u>Genotipos Propuestos</u>	<u>NºObservados</u>	<u>NºEsperados</u>
Amp-4 <sup>1/1</sup>	9	6.46
Amp-4 <sup>1/2</sup>	25	29.74
Amp-4 <sup>1/3</sup>	9	9.43
Amp-4 <sup>2/2</sup>	38	34.23
Amp-4 <sup>2/3</sup>	19	21.70
Amp-4 <sup>3/3</sup>	5	3.44

$\chi^2_3 = 3.23; p = 0.36$

Tabla 114. Comparación de las frecuencias genotípicas absolutas observadas y esperadas para el locus Amp-4 en P. alpataco (Chacharramendi).

<u>Genotipos Propuestos</u>	<u>NºObservados</u>	<u>NºEsperados</u>
Amp-4 <sup>1/1</sup>	8	6.42
Amp-4 <sup>1/2</sup>	20	24.56
Amp-4 <sup>1/3</sup>	12	10.67
Amp-4 <sup>2/2</sup>	25	23.50
Amp-4 <sup>2/3</sup>	22	20.42
Amp-4 <sup>3/3</sup>	3	4.43

$\chi^2_3 = 2.08; p = 0.56$

Tabla 115. Comparación de las frecuencias genotípicas absolutas observadas y esperadas para el locus Amp-4 en P. caldenia (Santa Rosa).

Genotipos Propuestos	Nº Observados	Nº Esperados
Amp-4 <sup>1/1</sup>	9	5.10
Amp-4 <sup>1/2</sup>	15	23.15
Amp-4 <sup>1/3</sup>	12	11.59
Amp-4 <sup>2/2</sup>	33	26.26
Amp-4 <sup>2/3</sup>	21	26.31
Amp-4 <sup>3/3</sup>	9	6.59

---

$$\chi^2_3 = 9.55; p = 0.02$$

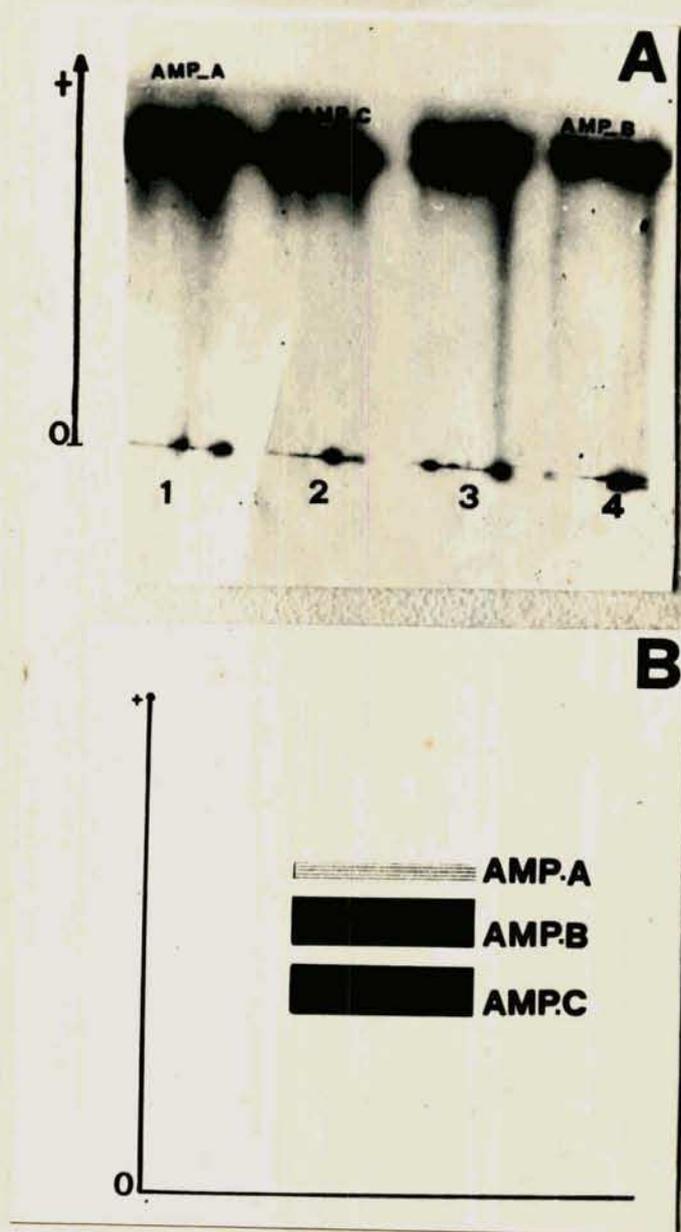


Figura 15. A) Zimograma de aminopeptidasas de individuos de especies de la Sección Strombocarpa: 1 y 2, *P. strombulifera* (9563,19); 3 y 4, *P. reptans* (166). B) Esquema de las bandas observadas en los individuos de las especies analizadas.

Determinación de los probables loci y alelos.

Para la determinación de loci y alelos se utilizaron los mismos sustratos que para las especies de la Sección Algarobia.

En la Tabla 116 se observan los resultados obtenidos en cotiledón // de plántulas con 7 días de crecimiento.

La isoenzima AMP-A sólo reacciona con el sustrato A. Las restantes / bandas no reaccionan con este sustrato pero sí lo hacen con B, D y muy levemente con C. Estos resultados harían suponer que AMP-A está codificada por un gen monomórfico, común a todas las poblaciones y al cual se denominó /// Amp-A.

Las diferentes combinaciones que presentan las bandas AMP-B y AMP-C/ en P.reptans y P.strombulifera de Catamarca y sus similitudes al reaccionar/ con los diferentes sustratos permitió postular, que ellas estarían codificadas por un gen polimórfico con 2 alelos ~~codominantes~~, Los mismos fueron denominados Amp-B<sup>1</sup> y Amp-B<sup>2</sup>, y codificarían respectivamente para las bandas /// AMP-B y AMP-C.

El gen Amp-B sería monomórfico en la población de Río Negro de //// P.strombulifera, encontrándose solamente el alelo Amp-B<sup>2</sup>.

En base a estas hipótesis se numeran a continuación los diferentes / fenotipos observados y su probable genotipo:

LOCI PROPUESTOS	GENOTIPOS PROPUESTOS	BANDAS
Amp-A	Amp-A <sup>1/1</sup>	AMP-A
Amp-B	Amp-B <sup>1/1</sup>	AMP-B
	Amp-B <sup>1/2</sup>	AMP-B y C.
	Amp-B <sup>2/2</sup>	AMP-C

Tabla 116. Comparación de la intensidad de tinción de las bandas con actividad aminopeptidasa en cotiledón epicótilo e hipocótilo de 7 días, usando diferentes sustratos, en poblaciones de especies de la Sección Strombocarpa. Intensidad de tinción: +++= intensa, ++= media, +== tenue, /---= tenue o ausente, ---= ausen te. Sustratos: (A)= clorhidrato de p- nitroanilida de N- $\alpha$ -benzoil-DL- arginina, (B)= clorhidrato de  $\beta$ naftil amida de 4- metoxi- L- leucina, (C)= clorhidrato de  $\beta$ naftilamida de N- $\alpha$ - benzoil- DL- arginina, (D)= clorhidra to de  $\beta$ -naftilamida de L- leucina. Especies: P. strombulifera y P. reptans.

O R G A N O S

BANDAS	COTILEDON				EPICOTILO				HIPOCOTILO			
	(A)	(B)	(C)	(D)	(A)	(B)	(C)	(D)	(A)	(B)	(C)	(D)
AMP-A	+++	---	---	---	/---	---	---	---	/---	---	---	---
AMP-B	---	+++	/---	++	---	++	---	+++	---	/---	/---	/---
AMP-C	---	+++	/---	++	---	++	---	+++	---	/---	/---	/---

En la tabla 120 se dan las frecuencias alélicas, calculadas a partir de los números observados para los diferentes loci de AMP. Por medio de una prueba de  $\chi^2$  se comparó si las frecuencias observadas del locus Amp-B en //// P.reptans y P.strombulifera de Catamarca se apartaban de las frecuencias esperadas para un equilibrio de Hardy e Weinberg (Tablas 117 y 118).

En ambas poblaciones las diferencias no son significativas ( $P > 0,05$ ).

Tabla 117. Comparación de las frecuencias genotípicas absolutas observadas y esperadas para el locus Amp-B en P. reptans (Sgo. del Estero).

Genotipos Propuestos	Nº Observados	Nº Esperados
Amp-B <sup>1/1</sup>	6	4.49
Amp-B <sup>1/2</sup>	26	28.94
Amp-B <sup>2/2</sup>	48	46.57

$\chi^2_1 = 0.85$ ;  $p = 0.36$

Tabla 118. Comparación de las frecuencias genotípicas absolutas observadas y esperadas para el locus Amp-B en P. strombulifera (Catamarca).

Genotipos Propuestos	Nº Observados	Nº Esperados
Amp-B <sup>1/1</sup>	1	0.41
Amp-B <sup>1/2</sup>	8	9.14
Amp-B <sup>2/2</sup>	51	50.45

$\chi^2_1 = 0.99$ ;  $p = 0.32$

SUPEROXIDO DISMUTASA E.C. 1,15,1,1. (SOD)

Selección de los órganos utilizados

Para el análisis de este sistema se estudiaron semillas 24 hs. después de iniciada la germinación y cotiledones de plántulas con aproximadamente 3, 7 y 20 días de crecimiento.

La mayor actividad enzimática fue detectada en semillas 24 hs. después de la germinación. A medida que la plántula crece las bandas se hacen // más tenues, y se dificulta su identificación.

Los cotiledones de edades diferentes fueron utilizados para determinar los posibles loci y alelos.

Secciones Algarobia y Strombocarpa

A pesar de que no es posible homologar las bandas de una Sección con respecto a la otra se tratarán en conjunto, debido a que todos los individuos analizados de las diferentes especies de ambas Secciones mostraron un único / patrón isoenzimático, sin ninguna variación. El mismo se compone de 5 bandas / (Fig. 16 A y B), las cuales fueron denominadas en orden decreciente de velocidad de migración electroforética SOD-1, SOD-2, SOD-3, SOD-4 y SOD-5 respectivamente.

Al estudiar los individuos provenientes de árboles híbridos dentro / de la Sección Algarobia, se obtuvieron las mismas bandas descritas, por lo / cual se supuso que los mismos loci están presentes en las diferentes especies.

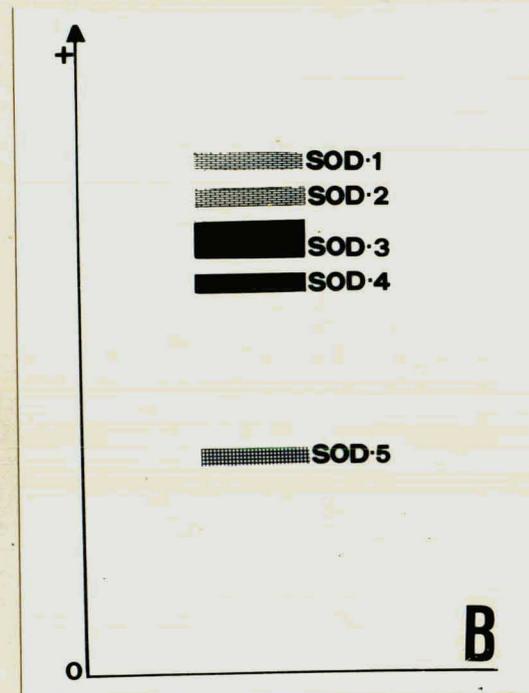
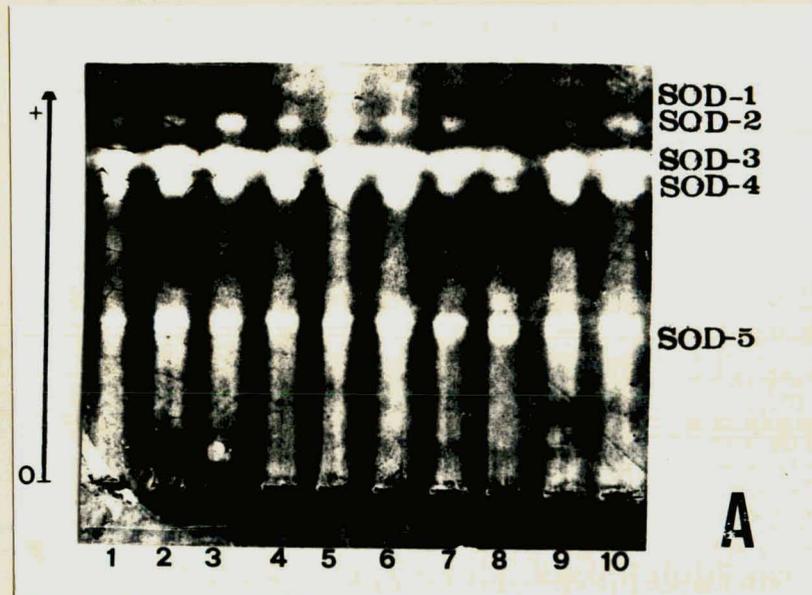


Figura 16. A) Zimograma de superóxido dismutasa de individuos de especies de las Secciones Algarobia y Strombocarpa: 1, *P. ruscifolia* (710); 2, *P. nigra* (139); 3, *P. alba* (323); 4, *P. hassleri* (320); 5, *P. alpataco* (112); 6, *P. flexuosa* (127); 7, *P. caldenia* (118); 8, *P. ruscifolia* (307); 9, *P. strombulifera* (19); 10, *P. reptans* (166). B) Esquema de las bandas observadas en los individuos de las especies analizadas.

Determinación de los probables loci y alelos.

Debido a que en este sistema no ha sido posible realizar pruebas químicas que permitan saber si estas 5 enzimas están codificadas por alelos de un gen o por genes distintos y que la utilización de los individuos híbridos no da información adicional, ya que no hay segregación de las bandas, se tomaron en cuenta otros criterios para determinar los posibles loci y alelos. Ellos han sido descritos en Materiales y Métodos.

En las diferentes especies de las dos secciones se pudo observar que SOD-5 se encuentra demasiado alejada de las restantes 4 bandas para ser considerada alélica de ellas. Por lo tanto, se supuso que esta banda estaría codificada por un locus monomórfico particular denominado Sod-5.

Las otras 4 bandas migran próximas entre sí, pero la banda SOD-3 presenta 2 características que la diferencian de SOD-1, 2 y 4: a) tiene una intensidad mucho mayor que las otras bandas, y b) cuando se analizan cotiledones con más de 7 días de edad, solamente se encuentran presentes las bandas SOD-3 y SOD-5, mientras que las demás bandas, prácticamente han desaparecido. Estas dos características hicieron suponer que la banda SOD-3 está codificada por otro locus monomórfico al que se denominó Sod-3.

La banda SOD-4 presenta dos características diferenciales con respecto a SOD-1 y a SOD-2; a) está bastante alejada de ellas y b) cuando el cotiledón pierde el tegumento seminal (aproximadamente 3 a 4 días de germinación de la plántula), se la sigue observando nítidamente a diferencia de SOD-1 y SOD-2 que tienden a desaparecer. Este comportamiento distinto de la banda SOD-4, con respecto a SOD-1 y 2, hizo suponer que aquélla estaría codificada por un gen monomórfico al cual se denominó Sod-4.

No se pudo decidir si las bandas SOD-1 y SOD-2 están codificadas por alelos de un gen o por genes distintos. Si fueran alelos de un gen, los individuos deberían ser heterocigotas permanentes, ya que siempre están presentes ambas bandas y debería existir un mecanismo selectivo por el cual los homoci-

gotas fueran eliminados de la población, Este hecho no parece ser probable /// debido a la carga segregacional que implicaría, En unos pocos individuos SOD-1 parecería desaparecer antes que SOD-2, a partir de aproximadamente 10 días de germinación, pero esta observación no pudo ser confirmada en un mayor número / de individuos. Por lo tanto, ante lo improbable de la hipótesis de heterocigotas permanentes, se asumió la hipótesis más sencilla de que las bandas SOD-1 y SOD-2 están codificadas por dos genes monomórficos diferentes denominados Sod-1 y Sod-2 respectivamente.

En base a estas hipótesis se numeran a continuación los fenotipos observados y los correspondientes genotipos postulados,

LOCI PROPUESTOS	GENOTIPOS PROPUESTOS	BANDAS
Sod-1	Sod-1 <sup>1/1</sup>	SOD-1
Sod-2	Sod-2 <sup>1/1</sup>	SOD-2
Sod-3	Sod-3 <sup>1/1</sup>	SOD-3
Sod-4	Sod-4 <sup>1/1</sup>	SOD-4
Sod-5	Sod-5 <sup>1/1</sup>	SOD-5

Variabilidad intrapoblacional e Identidad Genética Entre Poblaciones.

En base a las frecuencias alélicas (Tablas 119 y 120) se calculó para cada población el porcentaje de loci polimórficos ( $P$ ) y la frecuencia media esperada de heterocigotas por locus (o índice polimórfico:  $\bar{H}=P.I.$ ) (Tablas 121 y 122). Dentro de cada Sección se calcularon además, para todos los pares de poblaciones, los índices de identidad genética media y distancia genética // (Nei, 1972) (Tablas 123 y 124). Finalmente, en base a la identidad genética, / utilizando el método de análisis de agrupamiento de medias no ponderadas (UPG / MA) (ver Crisci y Armengol, 1983) se construyó el dendrograma correspondiente / para las especies de la Sección Algarobia (Fig. 17).

Tabla 119. Frecuencias alélicas en las diferentes poblaciones de las especies de la Sección Algarobia.

Alélos	<i>P. muscifolia</i> Copo	<i>P. muscifolia</i> Formosa	<i>P. muscifolia</i> Avellaneda	<i>P. muscifolia</i> Chaco	<i>P. muscifolia</i> S. Estero	<i>P. nigra</i> E. Ríos	<i>P. nigra</i> Formosa	<i>P. hassleri</i> Formosa	<i>P. alpataco</i> Chacharramendi	<i>P. flexuosa</i> Cura-Có	<i>P. calderia</i> Santa Rosa
Est-2 <sup>1</sup>	0.071	0.000	0.093	0.000	0.071	0.143	0.380	0.097	0.415	0.167	0.245
Est-2 <sup>2</sup>	0.593	0.783	0.557	0.741	0.522	0.614	0.385	0.583	0.415	0.515	0.464
Est-2 <sup>3</sup>	0.336	0.218	0.350	0.259	0.407	0.243	0.235	0.320	0.170	0.318	0.291
Est-3 <sup>0</sup>	0.750	0.774	0.730	0.619	0.607	0.355	0.685	0.730	0.961	0.781	0.730
Est-3 <sup>1</sup>	0.250	0.226	0.270	0.381	0.393	0.645	0.315	0.270	0.039	0.219	0.270
Est-4 <sup>0</sup>	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.411
Est-4 <sup>1</sup>	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.589
Est-5 <sup>0</sup>	0.351	0.551	0.551	0.411	0.720	0.745	0.910	0.860	0.870	0.750	0.771
Est-5 <sup>1</sup>	0.649	0.449	0.449	0.589	0.280	0.255	0.090	0.140	0.130	0.250	0.229
Got-1 <sup>1</sup>	0.063	0.080	0.185	-----	0.000	0.000	0.022	0.055	0.000	0.000	0.042
Got-1 <sup>2</sup>	0.937	0.920	0.815	-----	0.421	0.701	0.978	0.945	0.715	0.442	0.958
Got-1 <sup>3</sup>	0.000	0.000	0.000	-----	0.579	0.299	0.000	0.000	0.285	0.558	0.000
Got-2 <sup>1</sup>	0.857	0.785	0.070	-----	0.242	0.611	0.221	0.226	0.110	0.285	0.000
Got-2 <sup>2</sup>	0.143	0.215	0.765	-----	0.758	0.389	0.779	0.774	0.890	0.715	0.967
Got-2 <sup>3</sup>	0.000	0.000	0.165	-----	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.033
Got-3 <sup>1</sup>	0.903	1.000	0.910	-----	0.750	0.336	0.192	0.192	0.425	0.392	1.000
Got-3 <sup>2</sup>	0.097	0.000	0.090	-----	0.250	0.664	0.808	0.808	0.575	0.608	0.000
Prx-1 <sup>0</sup>	-----	0.900	0.977	-----	0.920	0.830	0.584	0.685	0.339	0.730	0.612
Prx-1 <sup>1</sup>	-----	0.100	0.023	-----	0.080	0.170	0.416	0.315	0.661	0.270	0.388
Prx-2 <sup>0</sup>	-----	0.354	0.000	-----	0.320	0.680	0.509	0.424	0.750	0.749	0.590
Prx-2 <sup>1</sup>	-----	0.646	1.000	-----	0.680	0.320	0.491	0.576	0.250	0.251	0.410
Prx-3 <sup>0</sup>	-----	0.000	0.000	-----	0.649	0.500	0.000	0.000	0.000	0.530	0.561
Prx-3 <sup>1</sup>	-----	1.000	1.000	-----	0.351	0.500	1.000	1.000	1.000	0.470	0.439

CONTINUA

Tabla 119. CONTINUACION.

Alelos	<i>P. ruscifolia</i> Copo	<i>P. ruscifolia</i> Formosa	<i>P. ruscifolia</i> Avellaneda	<i>P. ruscifolia</i> Chaco	<i>P. nigra</i> S. Estero	<i>P. nigra</i> E. Ríos	<i>P. alba</i> Formosa	<i>P. hassleri</i> Formosa	<i>P. alpataco</i> Chacharramendi	<i>P. flexuosa</i> Cura-Có	<i>P. caldenia</i> Santa Rosa
Amp-1	-----	1.000	1.000	-----	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
Amp-2	-----	0.000	0.000	-----	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000	1.000	1.000
Amp-3	-----	0.000	0.000	-----	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000
Amp-4 <sup>1</sup>	-----	0.115	0.085	-----	0.250	0.324	0.294	0.211	0.267	0.248	0.227
Amp-4 <sup>2</sup>	-----	0.705	0.715	-----	0.482	0.352	0.643	0.675	0.511	0.571	0.515
Amp-4 <sup>3</sup>	-----	0.180	0.200	-----	0.268	0.324	0.063	0.114	0.222	0.181	0.258
Adh-1 <sup>1</sup>	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.000	0.000	0.807	0.640	0.659
Adh-1 <sup>2</sup>	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000	1.000	0.121	0.250	0.283
Adh-1 <sup>23</sup>	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.072	0.110	0.058
Adh-2	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
6-Pgd-1	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000	1.000	0.000	0.000	1.000	1.000	0.000
6-Pgd-2	1.000	1.000	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
6-Pgd-3	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
6-Pgd-4	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000
Sod-1	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
Sod-2	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
Sod-3	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
Sod-4	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
Sod-5	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Tabla 120. Frecuencias alélicas en las diferentes poblaciones de las especies de la Sección Strombocarpa.

Alelos	<i>P. reptans</i> Sgo. del Estero	<i>P. strombulifera</i> Catamarca	<i>P. strombulifera</i> Río Negro
Est-1	1.000	1.000	1.000
Est-2	1.000	1.000	1.000
Est-3	1.000	1.000	1.000
Est-4	1.000	1.000	1.000
Adh-6	1.000	1.000	1.000
Adh-7	1.000	1.000	1.000
Amp-A	1.000	1.000	1.000
Amp-B <sup>1</sup>	0.237	0.083	0.000
Amp-B <sup>2</sup>	0.763	0.917	1.000
6-Pgd-A	1.000	1.000	1.000
6-Pgd-B	1.000	1.000	1.000
Got-A <sup>1</sup>	0.045	0.350	0.060
Got-A <sup>2</sup>	0.955	0.650	0.940
Got-B <sup>1</sup>	0.275	0.551	0.260
Got-B <sup>2</sup>	0.725	0.449	0.740
Got-C	1.000	1.000	1.000
Got-D	1.000	1.000	1.000
Got-E	1.000	1.000	1.000
Got-F	1.000	1.000	1.000
Prx-A	1.000	1.000	1.000
Prx-B <sup>1</sup>	0.420	1.000	1.000
Prx-B <sup>2</sup>	0.137	0.000	0.000
Prx-B <sup>0</sup>	0.443	0.000	0.000
Sod-1	1.000	1.000	1.000
Sod-2	1.000	1.000	1.000
Sod-3	1.000	1.000	1.000

(CONTINUA)

Tabla 120. CONTINUACION

Alelos	<i>P. reptans</i> Sgo. del Estero	<i>P. strombulifera</i> Catamarca	<i>P. strombulifera</i> Río Negro
Sod-4	1.000	1.000	1.000
Sod-5	1.000	1.000	1.000

Tabla 121. Porcentaje de loci polimórficos (P) y frecuencia media esperada de heterocigotas por locus (H), en poblaciones de especies de Prosopis de la Sección Algarobia.

ESPECIES y POBLACIONES	H $\pm$ E.S.	% P	Nº de <u>Loci</u>
<u>P. ruscifolia</u> Formosa	0.132 $\pm$ 0.041	38	21
<u>P. ruscifolia</u> Avellaneda	0.132 $\pm$ 0.044	38	21
<u>P. ruscifolia</u> Copo	0.119 $\pm$ 0.046	38	16
<u>P. ruscifolia</u> Chaco	0.103 $\pm$ 0.055	23	13
<u>P. nigra</u> Sgo. del Estero	0.207 $\pm$ 0.052	48	21
<u>P. nigra</u> Entre Ríos	0.219 $\pm$ 0.054	48	21
<u>P. alba</u> Formosa	0.171 $\pm$ 0.051	45	20
<u>P. hassleri</u> Formosa	0.168 $\pm$ 0.047	45	20
<u>P. alpataco</u> Chacharramendi	0.172 $\pm$ 0.048	45	22
<u>P. flexuosa</u> Cura-Có	0.230 $\pm$ 0.052	50	22
<u>P. caldenia</u> Santa Rosa	0.199 $\pm$ 0.052	48	23

Tabla 122. Porcentaje de loci polimórfico (P) y frecuencia media esperada de heterocigotas por locus ( $\bar{H}$ ), en poblaciones de especies de Prosopis de la Sección Strombocarpa.

EPECIES y POBLACIONES	$\bar{H} \pm E.S.$	%P	Nº de <u>Loci</u>
<u>P. strombulifera</u> Río Negro	0.022 $\pm$ 0.017	9	23
<u>P. strombulifera</u> Catamarca	0.048 $\pm$ 0.029	13	23
<u>P. reptans</u> Sgo. del Estero	0.063 $\pm$ 0.034	17	23

Tabla 123. Indices de similitud y distancia genética (Nei, 1972) entre poblaciones de especies de la Sección Strombocarpa.

ESPECIES y POBLACIONES	<u>P. strombulifera</u> Río Negro	<u>P. strombulifera</u> Catamarca	<u>P. reptans</u> Avellaneda	
<u>P. strombulifera</u> Río Negro	-----	0.999	0.983	I D E N T I D A D
<u>P. strombulifera</u> Catamarca	0.010	-----	0.974	
<u>P. reptans</u> Sgo. del Estero	0.017	0.026	-----	

D I S T A N C I A

Tabla 124. Índices de similitud y distancia genética (Nei, 1972) en especies de la Sección Algarobia.

	<i>P. ruscifolia</i> Formosa	<i>P. ruscifolia</i> Avellaneda	<i>P. nigra</i> S.Estero	<i>P. nigra</i> E. Ríos	<i>P. alba</i> Formosa	<i>P. hassleri</i> Formosa	<i>P. alpataco</i> Chacharramendi	<i>P. flexuosa</i> Cura-Có	<i>P. caldenia</i> Santa Rosa
<i>P. ruscifolia</i> Formosa	-----	0.959	0.833	0.830	0.814	0.834	0.769	0.778	0.757
<i>P. ruscifolia</i> Avellaneda	0.041	-----	0.851	0.801	0.829	0.849	0.778	0.778	0.774
<i>P. nigra</i> S.Estero	0.183	0.161	-----	0.946	0.814	0.828	0.861	0.920	0.787
<i>P. nigra</i> E. Ríos	0.186	0.222	0.056	-----	0.842	0.846	0.875	0.917	0.758
<i>P. alba</i> Formosa	0.206	0.188	0.206	0.171	-----	0.990	0.848	0.832	0.778
<i>P. hassleri</i> Formosa	0.182	0.163	0.188	0.167	0.010	-----	0.833	0.834	0.777
<i>P. alpataco</i> Chacharramendi	0.263	0.251	0.150	0.134	0.165	0.183	-----	0.956	0.817
<i>P. flexuosa</i> Cura-Có	0.252	0.251	0.083	0.087	0.184	0.181	0.045	-----	0.826
<i>P. caldenia</i> Santa Rosa	0.279	0.256	0.240	0.275	0.251	0.252	0.202	0.192	-----

D I S T A N C I A G E N E T I C A

I  
D  
E  
N  
T  
I  
D  
A  
D  
  
G  
E  
N  
E  
T  
I  
C  
A

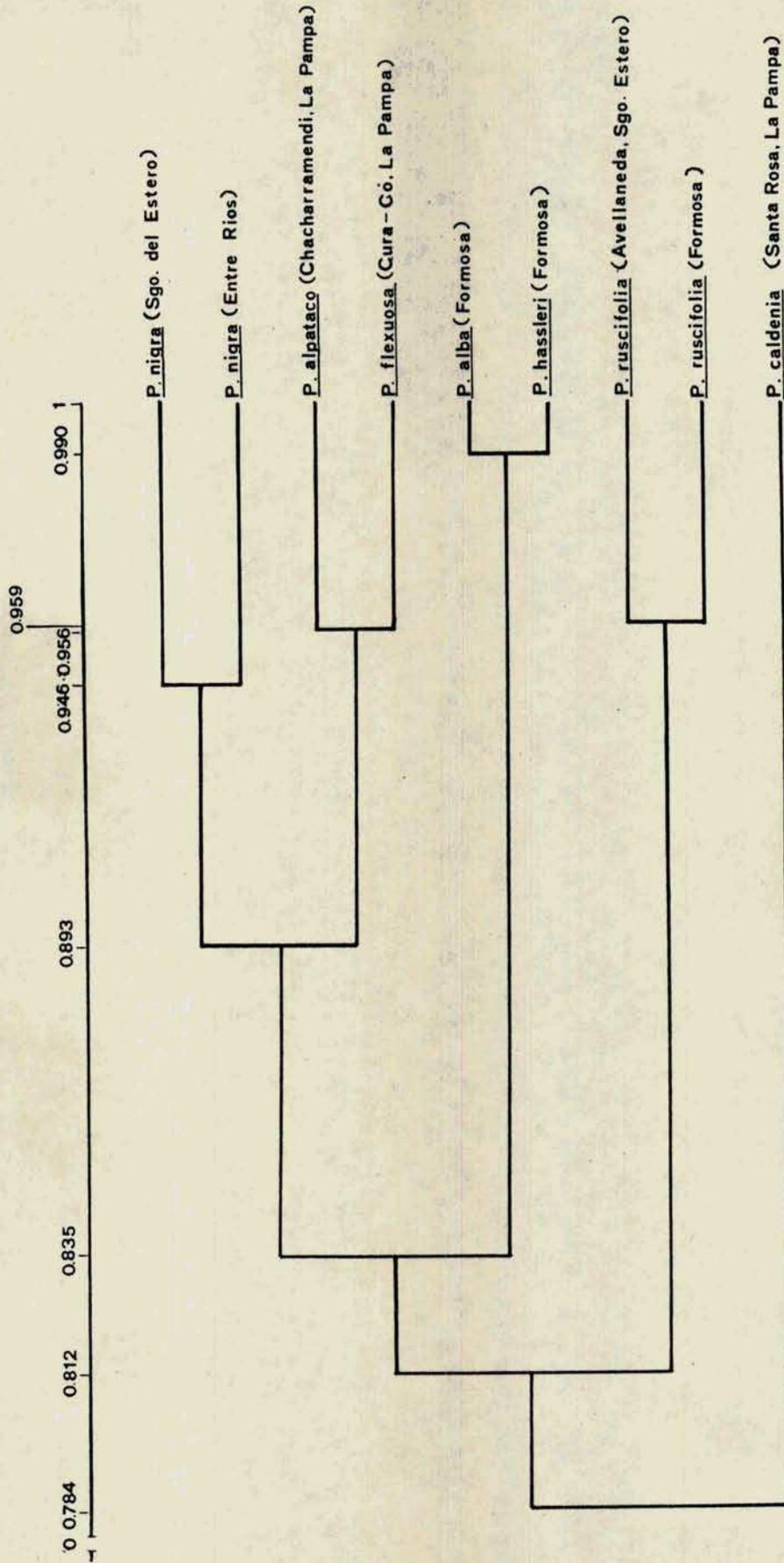


Figura 17. Fenograma representativo de las similitudes relativas entre las poblaciones estudiadas de especies de la Sección Algarobia.

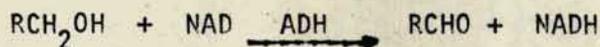
## DISCUSION

Las isoenzimas están estrechamente relacionadas con las diferentes // funciones fisiológicas del individuo. Es interesante entonces examinar su posible papel funcional dentro del organismo, ya que algunos autores consideran que el mayor o menor polimorfismo [isoenzimático depende de la función que /// ellas cumplen en las diferentes rutas metabólicas.

### Alcohol Dehidrogenasa

Es una enzima ampliamente distribuida en los reinos animal y vegetal. En general reacciona con un gran número de alcoholes primarios y secundarios, de cadenas lineales y ramificadas, alifáticos y aromáticos.

La reacción general de la enzima alcohol dehidrogenasa es la siguiente:



En el caso del alcohol etílico, R es el grupo metilo.

El primer estudio genético detallado de la variación electroforética en ADH fue realizado en Drosophila (Johnson y Denniston, 1964; Grell et al., 1965). Estudios posteriores de esta enzima en otros organismos demostraron un considerable polimorfismo (Scandalios, 1969; Hart, 1970; Gottlieb, /// 1974 b; Shoji et al., 1978; Hancock y Lansing, 1982; Ellstrand et al., 1983; / etc.) y se observó en casi todos los casos que la estructura de la misma era dimérica.

Según los resultados observados en el presente estudio para este sistema, dentro de la Sección Algarobia esta enzima sería dimérica y estaría codi-

ficada por dos genes, uno de ellos monomórfico y común a todas las especies// (Adh-2) y otro locus (Adh-1), con diferentes alelos fijados o no en distintas entidades.

Los individuos presentaron patrones de 3 ó 6 bandas, resultado de // las interacciones alélicas y no alélicas.

Este sistema isoenzimático permitió diferenciar entre sí grupos de// especies (P.nigra-P.ruscifolia; P.alba-P.hassleri; P.flexuosa-P.alpataco-P.caldenia; P.vinalillo), tanto por la fijación de alelos diferentes en las distintas entidades, así como por diferencias cuantitativas (de intensidad de tinción) entre algunas de las especies. También permitió reconocer por su zimograma, individuos de origen híbrido .

En la Sección Strambocarpa, la enzima también se comportó como un dímero, y el patrón de 3 bandas, presente en todos los individuos de estas especies sería el resultado de la interacción no alélica de dos genes monomórficos (Adh-6 y Adh-7).

El hecho que los productos de dos genes separados mantengan su gran afinidad produciendo heteropolímeros sugiere que los dos loci corresponderían a genes parálogos que surgieron de un gen común original por duplicación génica, y que probablemente esta duplicación tenga un origen reciente. A medida que actúan las diferentes fuerzas evolutivas se van desarrollando mecanismos diferenciales de regulación génica , y los genes duplicados eventualmente se vuelven genes que codifican para enzimas diferentes con distintos sistemas regulatorios (Ohno, 1970). Tal vez las especies de la Sección Algarobia se encuentren en una etapa temprana de la diferenciación génica para este sistema isoenzimático, dado que los dos loci Adh-1 y Adh-2 conservan aún una alta homología.

Los patrones de 3 bandas para este sistema que aparecen en los indivi-

duos analizados, podrían indicar la selección de una estrategia adaptativa basada en la fijación de heterocigotas permanentes a nivel enzimático (Gottlieb 1974 b). Un patrón semejante se encontró en P. juliflora (Solbrig y Bawa, 1975), especie que podría ser para ADH un heterocigota permanente. La mentablemente en el estudio antes mencionado no se determinó el nivel de ploí día de la raza estudiada, ya que en P. juliflora existen razas diploides y tetraploides (Hunziker et al., 1975, 1977). De ser tetraploide, la heterocigosis / podría ser consecuencia de la poliploidía; si fuera así, se esperaría encontrar numerosos ejemplos de heterocigosidad fijada para otros loci enzimáticos (Roose y Gottlieb, 1976; Gottlieb, 1982). No obstante, del trabajo realizado / por Solbrig y Bawa (loc. cit.) no se desprendió la existencia de alguna otra / heterocigosis permanente a nivel enzimático, por lo cual parece más probable que se tratara de una raza diploide, y que el sistema ADH tuviera las mismas / características que las observadas en el presente trabajo.

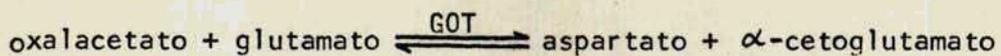
Otros patrones semejantes a los descriptos fueron encontrados en dis tintas especies entre las que se puede citar a Sorghum bicolor (Ellstrand et/ al., 1983), las especies diploides de Gossypium ramondii y G. herbaceum (Hancock y Lansing, 1982), Clakia franciscana (Gottlieb, 1974b), etc.

La heterocigosis permanente es considerada ventajosa porque permite / la complementación polipeptídica con ausencia de carga segregacional con la / posibilidad de que la divergencia entre los polipéptidos codificados por ge / nes diferentes permita una especialización diferencial. No obstante, esto tam / bién puede ser restrictivo, dado que las frecuencia alélicas no pueden respon / der a diferencias en presiones selectivas originadas por cambios temporales en / el ambiente y la ausencia de diversidad alélica puede limitar la adaptación a / heterogeneidades del ambiente (Fincham, 1972).

Glutamato Oxalacetato Transaminasa.

Esta es una enzima ampliamente distribuída en el reino vegetal, habiendo sido estudiada en Stephanomeria exigua (Gottlieb, 1973 b, 1975), trigo (Tang y Hart, 1975), maíz (Mac Donald y Brewbaker, 1972 a). También ha sido estudiada en ratón (Chapman y Ruddle, 1972) y humanos (Davidson et al., 1970). En la mayoría de los casos, esta enzima presenta una estructura dimérica.

La glutamato oxalacetato transaminasa cataliza la reacción:



que corresponde a una transaminación citoplasmática. Esta enzima también interviene en el metabolismo mitocondrial.

Este sistema permitió diferenciar las especies de la sección Algarobia, debido a la fijación de alelos alternativos en algunas de ellas, así como por las diferencias a nivel de las frecuencias génicas (Tabla 119).

Un detalle importante puesto de manifiesto al estudiar este sistema fue que semillas recogidas de árboles provenientes de enjambres híbridos y de terminados morfológica y cromatográficamente como P.flexuosa y P.alpataco, // presentaban para la zona GOT I y GOT II patrones correspondientes a 6 combinaciones diferentes (Fig. 5 D, E) dentro de las cuales estarían involucrados los alelos comunes a P.alpataco y P.flexuosa, así como aquellos característicos / de P.caldenia. Esto implicaría que el polen de P.caldenia podría fertilizar / individuos de P.alpataco y P.flexuosa. Sin embargo, al analizar semillas provenientes del mismo lugar de árboles determinados como P.caldenia, sólo se observó el patrón típico de esta última especie. Este hecho podría indicar que / P.caldenia no sería fecundada por el polen de P.flexuosa ni de P.alpataco // lo que indicaría la existencia de una barrera de aislamiento reproductivo incipiente entre P.caldenia y las otras dos especies.

Las especies de la Sección Algarobia son simpátridas y se hibridan // en amplias regiones de la Argentina. Sin embargo, siguen manteniendo sus diferencias génicas para este sistema, lo que sugeriría que las enzimas características de cada una de las entidades son altamente adaptativas para el nicho que la especie ocupa, y que son mantenidas por fuerzas selectivas.

En las poblaciones de la Sección Strombocarpa las frecuencias alélicas para este sistema isoenzimático, fueron muy similares. Sin embargo, P. strombulifera de Catamarca se diferenció de las otras poblaciones por las frecuencias alélicas de los loci Got-A y Got-B (Tabla 120).

Según Johnson (1974), GOT es una enzima no regulatoria y presentaría una frecuencia media esperada de heterocigotas por locus muy baja. Este autor observó que en 12 especies de roedores estudiadas por otros autores la  $\bar{h}$  fue de 0,08, y en el hombre de 0. Sin embargo, en las especies de la Sección Algarobia la  $\bar{h}$  fue de 0,284 y en la Sección Strombocarpa 0,322, ambos valores superiores a los citados por Johnson. Discrepancias de este tipo han sido observadas para otros sistemas isoenzimáticos entre especies pertenecientes a // distintos grupos (Zouros, 1975). La explicación de esto sería que lo que determina la extensión del polimorfismo sería la estructura primaria más que la función proteica y por consiguiente las enzimas estructuralmente relacionadas presentarían un grado semejante de variación. Así, las enzimas con diferentes funciones podrían estar estructuralmente más cercanas entre sí que con respecto a enzimas con funciones similares (Zouros, loc. cit.).

### Esterasa

Son enzimas que se encuentran clasificadas según la "International // Unión of Biochemistry" (1971) como Hidrolasas (3) porque catalizan la hidrólisis de las uniones ésteres. El grupo 3.1 está dividido en 7 subgrupos, de los

cuales el E.C.3.1.1, de las hidrolasas de ésteres carboxílicos, comprende 41 clases, que están relacionadas con el metabolismo de los lípidos, dando origen a los ácidos grasos libres y glicéridos parciales.

Presentan una extrema heterogeneidad de formas isoenzimáticas y una gran especificidad por sustratos artificiales, lo que torna difícil su clasificación. Son específicas en su acción esterásica, no catalizando otras reacciones,

Las esterasas no actúan directamente en la diferenciación y organogénesis, pero sí reflejan diferentes situaciones metabólicas en diferentes / fases del desarrollo de los tejidos. No pertenecen al metabolismo energético y pueden clasificarse como enzimas del metabolismo intermedio. No se conoce la función específica de estas enzimas. Algunas actúan directamente sobre // sustratos exógenos y por eso están sujetas a variaciones ambientales (Johnson, 1974).

A través de las reacciones con diferentes inhibidores y sustratos, se han descrito 5 tipos principales de esterasas: carboxilesterasas (E.C.3.1.1.1.); arilesterasas (E.C.3.1.1.2.); acetilesterasas (E.C.3.1.1.6.); acetilcolinesterasas (E.C.3.1.1.7.) y colinesterasas (E.C.3.1.1.8.) (Holmes y Masters, 1967).

Estas enzimas se encuentran distribuidas en los reinos animal y vegetal y muchos han sido los trabajos realizados con relación a sus especificidades, así como su polimorfismo. Entre ellos se pueden citar los realizados en maíz (Schwartz, 1960, 1962 a, b, 1964 a, b, c, d, 1965 a, 1967; Mac Donald y Brewbaker, 1972 b, ) avena (Williamson et al., 1968), Hordeum (Bassiri, 1976; Hvid y Nielsen, 1977), Triticum y Aegilops (Nakai y Tsunewaki, 1971), Digitaria (Hayward y Hacker, 1980); Gossypium thurberi (Cherry y Katterman, 1971) diferentes especies de plantas diploides y autotetraploides inducidos por col

chicina (Nakai, 1977), Dacus oleae (Zouros et al., 1968); Drosophila (Johnson, et al., 1968; Korochkin et al., 1976), ratón (Pelzer, 1965), etc.

Como se indicó en Resultados, las frecuencias genotípicas del locus Est-2 de la sección Algarobia se ajustaban a las esperadas en todas las poblaciones a excepción de las correspondientes a P. hassleri (Tabla 65) y P. ruscifolia de Chaco (Tabla 53) en las cuales las diferencias con las frecuencias esperadas fueron significativas ( $p < 0.05$ ).

En estas especies se observó una tendencia a presentar una frecuencia de homocigotas mayor que la esperada. Una explicación para estas desviaciones podría ser simplemente error de muestreo.

Otra causa de este exceso de homocigotas podría ser autofecundación, pero esto no concordaría con ciertos fenómenos como: a) la existencia de protoginia (Burkart, 1952, 1976), b) la observación realizada durante este estudio de que con alta frecuencia se encuentran los 3 alelos del locus Est-2 / en los genotipos de individuos provenientes de la misma planta madre, y esto indicaría un alto grado de alogamia y por último, c) experimentos realizados por Simpson (1977) y Simpson y Solbrig (1977), que demostraron la existencia de la autoincompatibilidad en otras especies de este género (P. velutina, P. chilensis, P. flexuosa). Por lo tanto, y dado que las frecuencias esperadas para algunos genotipos son menores que 5, la primera hipótesis parece ser la más plausible.

Solbrig y Bawa (1975) estudiaron la variación isoenzimática en varias especies de Prosopis, incluyendo dos poblaciones de P. ruscifolia de Formosa. En la mayoría de las especies, ellos pudieron distinguir dos zonas de actividad de esterasas: La zona I con dos a cuatro bandas y la zona II con 4 a 6 / bandas. Las bandas de la zona I fueron más gruesas y de mayor intensidad de tinción. La excepción fue la banda 5 de la zona II, la cual en algunas espe-

cies se tiñe tan intensamente como las de la zona I. Encontraron, además, / que la zona II era variable en su expresión durante el desarrollo y no había una constancia en su patrón de esterasas. Por este motivo los datos de la zona II no fueron usados en la comparación intra e interespecífica realizada / por dichos autores. A pesar de que en el trabajo de Solbrig y Bawa se utili- zaron diferentes condiciones electroforéticas a las de la presente investiga- ción, tal vez se podría homologar las bandas de la zona I a las bandas EST-2 EST-3 y EST-4, y la zona II a las bandas EST-5, EST-6 y EST-7; finalmente, la banda 5 de dichos autores sería homóloga a la EST-6 del presente estudio.

Es interesante destacar que, en el presente trabajo, se han podido/ determinar los patrones de variación de la zona II durante el desarrollo pa- ra las tres poblaciones de Pruscifolia (Tabla 42). En base a esto y a la u- tilización de diferentes sustratos (Tablas 42 y 43) también pudieron postu- larse los posibles loci y alelos que codifican para estas isoenzimas en espoblaciones de ésta y las demás especies de la Secc. Algarobia. En el pre-// sente estudio se utilizaron las variaciones de intensidades de las bandas // EST-2, EST-3 y EST-4, con respecto a las bandas EST-5, EST-6 y EST-7 (Tabla 42) para postular que las diferentes formas de esterasas en P.ruscifolia es- tarían sujetas a distintos sistemas de regulación. Las distintas poblacio- nes estudiadas de esta especie no diferirían en cuanto a este sistema de regulación.

Whitmore y Bragg (1979) en un estudio de diferenciación isoenzimáti- ca entre P.glandulosa var. glandulosa y P.pallida, también encontraron varia- ción en los patrones de esterasa durante el desarrollo.

En las otras especies aquí estudiadas fue posible también proponer los/ posibles loci y alelos implicados en la producción de las esterasas, pero en este caso sólo fueron utilizados diferentes sustratos.

En general, el polimorfismo así como la ñ encontrada para este sis-

tema en plantas y animales es alto, Por ejemplo, Stephanomeria exigua ssp. // carotífera (Gottlieb, 1975), presenta el locus Est-2 con 7 alelos y Est-3 // con 8 alelos; en maíz, Mac Donald y Brewbaker (1972 b), encontraron 38 bandas correspondientes a 10 loci; dentro del complejo Briza fueron encontradas entre 10 a 26 bandas (Torres de Lemos, 1983); en Picea abies (Lundkvist y Rudin, 1977) observaron un locus con 6 alelos; Johnson (1974), encontró en Drosophila una  $\bar{H}$  para las esterasas de 0.43 y en 12 especies de roedores, // 0.3.

Hechos similares también se dan en las especies de la Sección Algarobia donde se encontraron un total de 7 bandas codificadas por 5 loci y una  $\bar{H}$  de 0.334. En la Sección Strombocarpa no fue calculada la  $\bar{H}$  debido a la imposibilidad de establecer loci y alelos; de todas maneras, hay aproximadamente 12 bandas, algunas de las cuales presentaron variación.

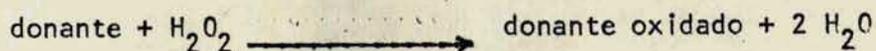
El hecho de encontrar un alto grado de polimorfismo y de  $\bar{H}$  en estas especies, estaría relacionado según Johnson (1974) con la gran capacidad de estas enzimas de reaccionar con sustratos exógenos y endógenos. Sin embargo, parecería que esto no es tan general ya que en Drosophila, Zouros (1975) encontró que el 23 % de las hidrolasas son monomórficas y figuran entre los loci mas conservadores estudiados, y recíprocamente, la esterasa A de la mosca del olivo Dacus oleae, está asociada con el sistema nervioso y puede tener un sustrato interno específico, es altamente polimórfica ( $\bar{H} = 0.72$ ) con más de 15 alelos.

### Peroxidasa

Las peroxidasa son hemoproteínas que contienen una ferroprotoporfirina como grupo prostético. Son enzimas cuya función primaria es reducir el peróxido de hidrógeno a costa de moléculas donantes de hidrógeno tales como/

sustancias fenólicas, citocromo C, nitritos, ácido ascórbico, indoles, aminas y ciertos iones inorgánicos,

Las peroxidasas catalizan la siguiente reacción:



Son inespecíficas con respecto al donante de hidrógeno, pero altamente específicas con respecto a su sustrato que es el peróxido de hidrógeno. Su escasa especificidad para con los dadores es una indicación de los diversos papeles funcionales de las varias formas peroxidásicas.

Algunas de las probables funciones de las peroxidasas en plantas son/ aquellas ligadas a los agentes de polimerización oxidativa de los precursores de la formación del complejo de la lignina (Stafford, 1974); actúan también de alguna forma sobre las membranas, previniendo daños en condiciones de frío excesivo (Mc Cown et al., 1969). Las peroxidasas están relacionadas con el metabolismo de hormonas vegetales tales como las giberelinas, citoquinas, etileno y, particularmente, auxinas, principalmente el ácido indolacético // (IAA), muy importante para el crecimiento de la planta (Mc Cune, 1961; Scandalios, 1964; Gardiner y Cleland, 1974). También han mostrado tener relación con la formación de la raíz (Gurumurti y Nanda, 1974), así como durante el / metabolismo del desarrollo (Simon et al., 1974).

En Prosopis, se observó mayor actividad peroxidásica, tanto en número de bandas como en la intensidad de las mismas a medida que la plántula envejecía (en plántulas de menos de 3 días no se observó actividad peroxidásica). Estos resultados son, en cierta forma, concordantes con las principales actividades fisiológicas de esta enzima que son la lignificación y la inhibición del crecimiento. Otros autores encontraron resultados semejantes: en las hojas del tabaco (De Jong, 1972), donde se observó que la actividad peroxidási

ca aumentaba durante la maduración de las mismas y a medida que ocurría el envejecimiento de la planta; las peroxidasas, en lugar de inactivarse, aumentaban su actividad. Casos semejantes han sido encontrados en otras especies como / Datura (Conklin y Smith, 1971), tabaco (Sheen y Rebagay, 1970), Zea mays /// (Hamil y Brewbaker, 1969), etc.

La variabilidad intra e interespecífica encontrada en este sistema para Prosopis no es tan alta como las halladas en especies de otros géneros, como por ejemplo Nicotiana, donde diferentes especies mostraron 33 bandas distintas, variando de 3 a 10 por especie (Smith et al., 1970); 10 especies de / Datura, donde se encontraban 19 bandas variando de 3 a 10 por especie (Conklin y Smith, 1971); Relbunium, en el que se detectaron 35 bandas variando de 7 a 18 por especie (Smith-Cavalli, 1976); 250 variedades de maíz en las que / fueron detectadas cerca de 24 bandas (Hamil y Brewbaker, 1969), etc.

En las especies aquí estudiadas del género Prosopis, no se ha encontrado para este sistema isoenzimático un gran polimorfismo, ni una gran variación cualitativa. Lo mismo sucedió en otras dos especies de este género P.glandulosa y P.pallida, estudiadas por Whitmore y Bragg (1979), quienes encontraron / incluso actividad peroxidásica en semillas (utilizando otras condiciones electroforéticas) y afirman que de todos los sistemas analizados, es el menos variable. Ellos encontraron un total de 7 bandas, mientras que en las especies / estudiadas en este trabajo sólo pudieron ser interpretadas 3 bandas, y las / restantes tenían muy poca actividad peroxidásica como para poder distinguir / las. Otros investigadores también han encontrado en algunas especies números / relativamente bajos de bandas peroxidásicas, aunque éstos son casos poco comunes. Por otra parte, son raros los trabajos que hacen referencia al número de loci que controlan estas variantes enzimáticas en poblaciones de especies nativas. Gottlieb (1973 c) cita 3 loci peroxidásicos para Stephanomeria exigua / ssp. coronaria y la especie recientemente formada a partir de la primera, de-

nominada "Malheurensis", En la primera especie, un solo locus es polimórfico/ con dos alelos, siendo los demás monomórficos. En S. exigua ssp. carotifera // (Gottlieb 1975), sólo se citan dos loci peroxidásicos monomórficos. Estos últimos ejemplos de baja variabilidad enzimática, son semejantes a los encontrados en las especies estudiadas de Prosopis.

### Aminopeptidasa

Las aminopeptidasas, son clasificadas como un grupo de enzimas que catalizan la hidrólisis de varios tipos de uniones peptídicas. No poseen sustratos específicos y la reacción básica es la misma para todas las exopeptidasas y endopeptidasas.

La leucina aminopeptidasa (LAP) es una enzima que hidroliza el sustrato artificial clorhidrato de  $\beta$ naftilamida de L-leucina. Sin embargo, los trabajos de Scandalios y Espiritu (1969) Sakai et al. (1969), Ott y Scandalios / (1976), Laurie - Ahlberg (1982) y otros, mostraron que esta enzima tiene una baja especificidad por el sustrato, e hidroliza una serie de derivados en los cuales la leucina es sustituida por otros residuos de aminoácidos. Además, estas enzimas pueden ser distinguidas entre sí a través de diferentes propiedades como su estabilidad cinética, pH óptimo, el efecto de iones metálicos en su actividad (Patterson et al., 1963; Müller-Starck y Hüttermann, 1981), etc.

En vista de esos resultados fue propuesta la sustitución del nombre // leucina-aminopeptidasa por el más general de aminopeptidasa (Scandalios y Espiritu, 1969). No obstante, el nombre leucina aminopeptidasa no es totalmente inapropiado (Young et al., 1979) y, dado que existe una gran literatura donde se lo utiliza, es común que se lo use en forma intercambiable con el de amino peptidasa.

Se ha observado que estas enzimas incrementan tanto cualitativamente /

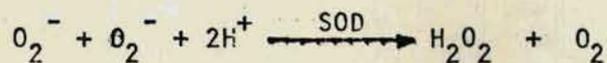


una misma Sección las frecuencia alélicas son semejantes, Este hecho tal vez// esté indicando que estas variantes Isoenzimáticas no tengan un gran significado en la adaptación ecogenética (Koehn et al., 1980 a, b,).

### Superóxido Dismutasa

Estas enzimas han sido detectadas en una amplia serie de organismos y/ están implicadas en el sistema de defensa esencial contra la toxicidad potencial del oxígeno molecular (Mc Cord et al., 1971). Como el oxígeno es tóxico,/ todos los organismos, procariontes y eucariontes que viven en contacto con / el aire y deben usar esta molécula tuvieron que desarrollar las defensas nece sarias. La facilidad con que el oxígeno es reducido a radical superóxido /// ( $O_2^-$ ) tanto en los procesos enzimáticos como no enzimáticos y el descubrimiento de la superóxido dismutasa que catalíticamente eliminaría esos radicales,/ sugieren que la toxicidad del oxígeno se relaciona con su conversión a  $O_2^-$ . Un examen de la actividad de la superóxido-dismutasa en organismos anaeróbicos / obligatorios y aerotolerantes apoyarían esta hipótesis. Se ha observado que / los individuos anaeróbicos aerotolerantes que sobreviven expuestos al aire y / metabolizan el oxígeno, exhiben actividad superóxido-dismutasa, mientras que/ no sucede lo mismo con los individuos anaeróbicos obligatorios (Mc Cord et al., 1971; Weisiger y Fridovich, 1973).

Esta enzima comprende una clase de metaloproteína que cataliza la si-/ guiente reacción:



Presumiblemente, el peróxido de hidrógeno generado por la reacción es subse- cuentemente descompuesto por la catalasa, por la peroxidasa o por la peroxidasa dependiente de glutatión, dentro de la célula.

La SOD fue descubierta en una variedad de organismos, como ser en el /  
citosol de las células de Neurospora crassa, trigo, etc., conteniendo átomos/  
de zinc y cobre (Baum y Scandalios 1979); también en las mitocondrias de po-/  
llos, en E.coli y Streptococcus mutans, presentandô en estos casos átomos de  
manganeso (Baum y Scandalios, 1979). La superóxido dismutasa encontrada en //  
las mitocondrias de las células del hígado de Gallus domésticus fue muy seme-  
jante a la hallada en E.coli y S.mutans. Esta similitud y la marcada diferen-  
cia con la SOD descubierta en el citosol de los eucariontes apoyaría la teo-/  
ría de que la mitocondria ha evolucionado a partir de procariontes aeróbicos,  
los cuales formaron una simbiosis endocelular con un protoeucarionte ./////  
(Weisiger y Fridovich, 1973).

Lumsden y Hall (1975) proponen una posible teoría del origen evolutivo  
de la SOD. Discuten la posibilidad de que los eventos evolutivos se hayan ini-  
ciado por la adquisición de una bacteria fotosintetizante que presentaba un /  
sistema enzimático para romper la molécula de agua. Este sistema estaría liga-  
do a una cadena fotosintética transportadora de electrones, resultando una fo-  
tosíntesis semejante a la de las plantas actuales. La enzima primitiva conten-  
dría manganeso y cumpliría un doble papel, ya que además de la función descrip-  
ta (generación de oxígeno), cumpliría con la desintoxicación de los radicales  
de oxígeno. Sugieren además que los primeros eucariontes tenían SOD con iones  
manganeso y durante la evolución habrían surgido enzimas con cobre y zinc.

No existen muchos trabajos donde la SOD haya sido usada para estudios/  
evolutivos y estimativos de las variabilidades intra e interespecíficas, lo//  
que se debería a que los investigadores se inclinaron por el análisis de sus  
propiedades químicas, físicas y catalíticas (Mc Cord et al., 1971; Weisiger y  
Fridovich, 1973; Edwards et al., 1978; Baum y Scandalios, 1979; etc.).

En general esta enzima es considerada muy conservadora y en  
diversos organismos presentó una heterocigosis media muy baja (0-0.036)

(Selander 1980) Lumsden y Hall (1975) encontraron dos a tres bandas en cuatro/algas fotosintéticas; en 11 poblaciones de Stephanomeria exigua ssp. carotifera se encontró un locus con dos alelos (Gottlieb, 1975); en Drosophila, un // locus (Ayala et al., 1974 b), en maíz 4 a 5 bandas (Baum y Scandalios, 1979), etc.

En todas las especies de Prosopis de ambas secciones se observaron en/ el presente estudio 5 formas electroforéticas. Ellas fueron denominadas SOD-1, SOD-2, SOD-3, SOD-4 y SOD-5; en ninguno de los tejidos analizados se detectó/ polimorfismo para ninguna de estas 5 bandas y por lo tanto la  $\bar{H}$  fue de cero./ Este dato concuerda con los obtenidos en otros organismos, donde también la heterocigosis fue muy baja.

La gran similitud entre las bandas de SOD en las dos Secciones, sugiere que estas enzimas serían características del género y que se han mantenido sin variación desde antes de la separación de las diversas entidades.

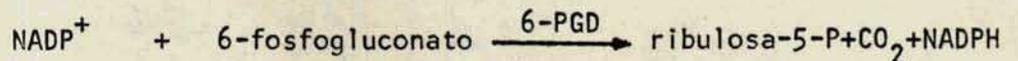
Dado que las SOD se pueden encontrar tanto en el citosol como en/ las mitocondrias, sería de interés estudiar en estas especies sus reacciones/ frente al CNH ya que se ha visto en otros eucariontes, entre ellos maíz (Baum y Scandalios, 1979) que las superóxido dismutasas ligadas a las mitocondrias/ son resistentes a este ácido. Esto último permitiría estimar el número de genes mitocondriales y nucleares que codifican para esta enzima.

#### 6-Fosfogluconato dehidrogenasa

Muchas células disponen, además de la glucólisis y el ciclo del ácido/ tricarboxílico, de otra ruta de degradación de la glucosa. Esta ruta también/ se llama ruta de los fosfatos de pentosa o desviación del monofosfato de hexo/ sa. La función principal de esta ruta es obtener capacidad de reducción en el/ citoplasma extramitocondrial en forma de NADPH y participar en la formación de

la glucosa a partir de  $\text{CO}_2$ , en las reacciones oscuras de la fotosíntesis. Las diversas etapas de esta ruta se realizan en la porción soluble del citoplasma extramitocondrial (ver Lehninger, 1972, pág. 377).

La reacción general en que participa esta enzima es la siguiente:



Esta enzima es considerada importante debido a las diferentes rutas metabólicas en donde participa. Ella ha sido estudiada bajo diferentes aspectos físicos, químicos y biológicos. Referidos a este último aspecto, se la ha utilizado para resolver problemas de regulación génica durante la ontogenia en embriones de Drosophila (Wright y Shaw, 1970), así como en la variación de la expresión génica durante el desarrollo en híbridos interespecíficos en diferentes especies de aves y su relación con otra enzima importante del ciclo de las pentosas, la 6-fosfogluconato deshidrogenasa (Leung y Haley, 1974).

Esta enzima es considerada por Johnson (1974) como una enzima no regulatoria y por lo tanto con bajo polimorfismo. En el hombre, la  $\bar{H}$  fue cero; en diferentes especies de Drosophila, 0.06; y en pequeños vertebrados, 0.11 /// (Johnson, 1974).

Esta enzima es monomórfica en especies de la familia Mimidae (Avise et al., 1981); en poblaciones de una especie del género Dipodomys presentó sólo/ un locus con dos alelos (Johnson y Selander, 1971); en maíz sólo se detectaron tres bandas (Endo, 1973).

En las especies del género Prosopis también se encontraron pocas bandas (una a dos por especie) y con una  $\bar{H}$  igual a cero. Esto coincidiría con la observación hecha por Gottlieb (1982) quien dice que la conservación del mismo/ número de enzimas en diferentes grupos de plantas refleja una gran conservación

de las actividades metabólicas en diferentes compartimientos subcelulares en// los que se requiere la misma reacción catalítica; y los mejores ejemplos hasta el momento son aquellas enzimas relacionadas con la glucólisis y el camino/ oxidativo de las pentosas.

Las bandas de 6-PGD son muy semejantes dentro de cada Sección de Proso pis, pero diferentes y difíciles de homologar entre Secciones. Esto indicaría que en una etapa temprana de la evolución de esas especies, esta enzima divir gió notablemente en los dos grupos estudiados.

Cuantificación de la variabilidad y diferencias interespecíficas,

A) Loci Diagnósticos

En las Tablas 119 y 120 se observan las frecuencias alélicas de los 7/ sistemas isoenzimáticos analizados en las diferentes poblaciones. El total / de loci analizados osciló entre 13; y 23, según la población considerada.

Las especies de la Sección Algarobia presentan prácticamente los mis- mos loci variando o no sus frecuencias alélicas y habiéndose fijado en algu- nas de ellas alelos diferentes (Tabla 119).

Se define como loci diagnósticos o divergentes a aquellos que: a) es-/ tán presentes en alguna especie y tienen un fenotipo electroforético distin- to de por lo menos otra, y b) que presentan poco o ningún polimorfismo y que son presumiblemente el producto de diferencias alélicas o génicas que se han fijado en distintas entidades.

De los 25 loci estudiados en esta Sección, siete (28 %) presentaron / alelos diagnósticos: Amp-2, presente sólo en P.alpataco, P.flexuosa y P.cal- denia; Amp-3, característico de P.caldenia; Adh-1<sup>1</sup> ausente en P.alba y P. // hassleri monomórfico en P.nigra y P.ruscifolia; Adh-1<sup>2</sup>, monomórfico en P.alba/ y P.,hassleri; 6-Pgd-1 presente sólo en P.nigra, P.alpataco y P.flexuosa; / 6-Pgd-2 característico de P.ruscifolia; 6-Pgd-4, característico de P.calde-/ nia (Tabla 119),

Las especies de la Sección Strombocarpa mostraron patrones isoenzimáti- cos muy semejantes, De los 23 loci analizados ninguno fue diagnóstico, aun-/ que Prx-B permite diferenciar las poblaciones de P.strombulifera de P.reptans (Tabla 120) por ser polimórfico en esta última y monomórfico en la primera.

Dada la gran similitud de los patrones isoenzimáticos entre especies de una misma Sección, resulta difícil por los zimogramas electroforéticos, ////

reconocer inequívocamente a las especies estudiadas; no así entre secciones / diferentes, donde los loci (isoenzimas) son muy distintos. Este hecho indicaría una gran afinidad entre las especies de una misma sección y por lo tanto/ poca divergencia génica entre las mismas, y una marcada diferenciación entre/ las dos Secciones.

B) Estimación de la variabilidad genética en las especies de Prosopis

B.1.1) Porcentaje de loci polimórficos: Sección Algarobia.

En la Tabla 121 se puede apreciar el porcentaje de loci polimórficos// (P) para las especies de esta Sección. El mismo osciló entre 23 % en P.ruscifolia de Chaco y 50 % en P.flexuosa. Siendo el promedio ( $\bar{P}$ ) en esta Sección / de 42,4 %.

Si se compara este valor con los obtenidos por otros autores en árboles y arbustos que poseen algunas de las características encontradas en Prosopis, tales como intervalo generacional prolongado, fecundación cruzada y alta fecundidad, se observa que existe una apreciable diferencia ya que éstos oscilan alrededor del 75,3 % (Hamrick et al., 1979). Sin embargo, en otro grupo / de árboles en los cuales el número de loci estudiado fue más alto, los valores de  $\bar{P}$  hallados fueron similares o aún menores que los de la Sección Algarobia de Prosopis. Así, en Bulnesia arborea y B.carrapo, estudiando 21 y 22 loci, Hunziker y Schaal (1983) obtuvieron un P de 28.6 % y 22.7 % respectivamente. En el octoploide Bulnesia bonariensis, estudiando 26 loci, se obtuvo, en cambio, un P = 46.1 % (Hunziker y Schaal, 1983). En Pinus pungens  $\bar{P}$  fue igual a 40 % (citado en Hamrick 1979).

El  $\bar{P}$  obtenido para las especies señaladas por Hamrick (1979) y por Hamrick et al., (1979) fue obtenido en muchos casos estudiando pocos loci por especie. Esto se observa en Eucalyptus obliqua, donde se estudiaron 3 genes; lo / mismo sucedió con Picea abies y Pinus sylvestris; cada uno de ellos con un P de 100 %. Esto podría dar una sobreestimación del porcentaje real de loci polimórficos en árboles. Selander (1980) en una recopilación de datos para medir P en plantas especialmente exogámicas, estimó el mismo en aproximadamente 46 %, valor semejante al encontrado en la Sección Algarobia.

B.1.2) Porcentaje de loci polimórficos: Sección Strombocarpa.

Esta Sección presentó muy bajo porcentaje de loci polimórficos (Tabla 122), ya que este valor osciló entre 17 % en P.reptans y 9 % en P.strombulifera de Catamarca siendo el promedio  $\bar{P}$  del 13 % (datos basados en 23 loci).

Este nivel se encuentra muy por debajo del  $\bar{P}$  para cualquiera de las// especies arbóreas presentadas por Hamrick (1979) y Hamrick et al. (1979) y / también por debajo de plantas herbáceas perennes ( $\bar{P}$ =26,3 %) y bienales ( $\bar{P}$ // 22%). Algunas consideraciones podrían explicar estas diferencias: a) el bajo / valor de  $\bar{P}$  fue obtenido sin considerar los loci polimórficos que controlaban algunas esterasas. De lo observado en resultados existen 3 zonas diferentes/ con gran polimorfismo isoenzimático, que no pudieron ser estudiadas en cuanto al número de genes que están implicados en la producción de estas bandas. Pero si se estima como mínimo que cada zona está codificada por un gen polimórfico, el P aumentaría hasta alcanzar los valores de 27 % en P.reptans, 23% en P.strombulifera de Río Negro y 19 % en P.strombulifera de Catamarca, con un  $\bar{P}$  de 23 %. Estos resultados seguirían siendo bajos, pero se acercaría a los hallados en otras especies arbóreas, como las del género Bulnesia // (Hunziker y Schaal, 1983). b) Dado que estas especies pueden reproducirse // por rizomas, la población muestreada pudo haberse originado en uno o unos pocos individuos altamente homocigotas. Es difícil aceptar ésta hipótesis, ya que las poblaciones de las especies coleccionadas fueron recogidas en lugares tan distantes uno de otro como Río Negro, Catamarca y Stgo, del Estero y en todas ellas se encontró muy baja variación alozímica y prácticamente los mismos genotipos homocigotas. c) Se podría suponer que en estas especies exista/ un limitado número de genotipos plásticos de amplia respuesta que permitan adaptarse a diferentes ambientes. d) Las especies de esta Sección tal / vez sean autocompatibles (contrariamente a lo que ocurriría/ en Algarobia), lo cual explicaría el alto porcentaje de ho

mocigotas. En un futuro próximo con experimentos de polinización controlada y de autofecundación se podría comprobar esta predicción.

B.2) Frecuencia media esperada de heterocigotas por locus ( $\bar{H}$ ):

Secciones Algarobia y Strombocarpa:

En general, las especies estudiadas del género Prosopis, no mostraron una gran heterocigosis, comparadas con otros árboles.

En la Tabla 121 se observan los  $\bar{H}$  de la Sección Algarobia. Estos oscilaron entre 0,103 en P.ruscifolia de Chaco y 0,230 en P.flexuosa, siendo el promedio para la Sección 0,168. Estos valores coinciden con los recopilados por Selander (1980) para plantas exogámicas ( $0,17 \pm 0,031$ ); sin embargo, se aleja mucho del valor encontrado por (Hamrick, 1979) para las especies arbóreas (0,354), valor éste que tal vez constituya una sobreestimación basada en casos en que se estudiaron pocos loci.

Las especies de la Sección Strombocarpa presentaron una  $\bar{H}$  (Tabla 122) que osciló entre 0,063 en P.reptans y 0,022 en P.strombulifera de Río Negro, siendo la media de 0,044. Estos valores están muy por debajo de los obtenidos tanto por Selander (1980) como por Hamrick (1979).

Las causas de la baja heterocigosis pueden ser variadas, pero tal vez esta falta de coincidencia sea debida a los pocos estudios de variabilidad genética en árboles tropicales, y por lo tanto los valores obtenidos hasta el momento podrían ser sobreestimaciones del grado real de variabilidad enzimática en estas especies. Además, es necesario también considerar que dentro de cada grupo, las estrategias adaptativas pueden ser diferentes, lo que implicaría diferencias en el grado de heterocigosis.

### B.3) Variabilidad genética en P.ruscifolia

P.ruscifolia es una especie que presenta características particulares. Es una leñosa que coloniza a) ecosistemas marginales originados por el proceso natural de rellenamiento de esteros; b) ecosistemas abiertos creados por el hombre, desde banquinas hasta pastizales sobrepastoreados, pasando por cultivos abandonados; c) pastizales y pajonales donde han dejado de actuar el fuego y las inundaciones como pulsadores periódicos. Por otra parte invade // ecosistemas ubicados en posición topográfica de cumbre, que son llamados saturados, es decir, los más ricos en especies de alta diversidad con tramas tróficas complicadas (Morello et al., 1971).

La diseminación de las semillas se produce por flotación en el agua y por vía endozoica (Morello et al., 1971; Morello y Adamoli, 1974; Solbrig y Cantino, 1975), sistemas que le permiten recorrer grandes distancias antes de germinar. Así, es probable que cada nueva población iniciada por esta especie sea producida por un número relativamente bajo de semillas que tienen la potencialidad, a) de adaptarse a un rango amplio de ambientes físicos, b) de crecer rápidamente y c) de presentar un gran potencial reproductivo, elaborado sobre la base de individuos con una muy alta producción de semillas fértiles.

De esta manera, cuando se inicia la nueva población, sus individuos atraviesan un estrecho "cuello de botella" (Nei et al., 1975), donde la variabilidad genética de la población declina rápidamente. Esta disminución del // promedio de alelos por locus está mas profundamente afectada por el tamaño del "cuello de botella" y en menor grado por la tasa de crecimiento de la población. Esto ocurre principalmente porque los fundadores de la nueva población constituyen una muestra pequeña, con poca variación genética y porque la deriva genética elimina muchos alelos que tienen baja frecuencia (Nei et al., // 1975).

Este hecho ha sido también observado en otras especies colonizadoras, /

en las cuales existe una gran depleción de variación genética, causada en parte por el efecto del fundador (Brown y Marshall, 1981).

A pesar de la baja variabilidad genética en poblaciones jóvenes de especies colonizadoras, se ha descubierto que generalmente la evolución subsecuente a esta etapa inicial tiende a que se alcance nuevamente niveles más altos de diversidad genética y una forma de obtenerlo es por medio de la hibridación con especies relacionadas (Mc Neill, 1976). Las dos poblaciones más ampliamente estudiadas (Formosa y Avellaneda), separadas por cientos de kilómetros, no mostraron diferir mayormente en sus frecuencias alélicas (tabla /// 119). Además, sus  $P$  y  $\bar{H}$  fueron muy similares y sus valores fueron más bajos que los de las demás especies estudiadas de la Sección Algarobia.

La poca divergencia entre las poblaciones indicaría que el efecto del fundador y la deriva genética no serían los únicos responsables de la baja variabilidad. Es probable que en esta especie colonizadora, la estrategia adaptativa no sea la de poseer numerosos genotipos sino, unos pocos que, fenotípicamente, serían lo suficientemente plásticos como para que puedan adaptarse a los múltiples y diferentes ambientes que invade.

#### Índices de similitud y distancias genéticas.

En las Tablas 123 y 124 se pueden observar las distancias genéticas ( $D$ ) y los índices de identidad genética media de Nei ( $I$ ). Ambos muestran la existencia de una gran similitud entre las especies, encontrándose casos como P.hassleri-P.alba y P.alpataco-P.flexuosa que tienen una similitud casi tan alta como la esperada para poblaciones de una especie (Avise, 1976). En base a los resultados obtenidos por Ayala et al. (1974 a, b y c) dentro del grupo de Drosophila willistoni así como por otros autores en diferentes grupos (Hall y Selander, 1973; Hunt y Selander, 1973; Avise y Smith, 1974 a, b; etc.),

Los índices de identidad genética obtenidos en este trabajo coincidirían con aquellos propuestos para semi y subespecies,

En el fenograma para las especies de la Sección Algarobia (Fig. 17) se visualizan gráficamente las similitudes genéticas. Hay que señalar que desde el punto de vista isoenzimático las afinidades entre las especies discrepan/ en algunos aspectos con la clasificación basada en caracteres morfológicos / propuesta por Burkart (1976). En particular, P. caldenia, que morfológicamente se agrupa con P. flexuosa, P. alpataco, P. nigra y P. alba, en el dendrograma basado en los datos isoenzimáticos parece aislada del resto de las especies/ de la Sección. Sin embargo, estos resultados son coherentes con el hecho que/ P. caldenia es la única especie del grupo que parece mostrar un incipiente // sistema de aislamiento reproductivo, ya que aparentemente no podría ser fe- / cundada por polen de P. flexuosa ni P. alpataco y que, desde el punto de vista ecológico, a diferencia de aquellas, su crecimiento está restringido a sue- / los arenosos y no tolera suelos salinos.

Por otra parte P. alba y P. hassleri presentaron un índice de simili- / tud tan alto (0,99), que se reúnen en un solo grupo aunque por su morfología están ubicadas en series distintas. Sin embargo, datos aportados por // Burghardt y Palacios (1981) estudiando electroforéticamente proteínas semina- / les, Palacios y Bravo (1981) estudiando compuestos fenólicos por cromatogra- / fía y trabajos realizados en el campo donde se observó un alto grado de hi- / bridación entre estas dos especies (Palacios, com. pers.), apoyarían los re- / sultados obtenidos en el presente estudio isoenzimático donde el, grado de / similitud entre P. alba y P. hassleri fue muy superior al esperado para especies bien diferenciadas,

A pesar de las evidentes diferencias morfológicas descritas por /// Burkart (1976) entre las especies de la Sección Algarobia, no se ha podido / demostrar una gran diferencia molecular entre las mismas. Además sus caracte-

rísticas cromosómicas ( $2n = 28$ ) tampoco permiten diferenciarlas (Hunziker et al., 1975, 1977). Estas observaciones, junto con la capacidad de hibridarse / en zonas de simpatria sugieren un grado de similitud genética que resulta difícil de conciliar con la gran diferencia morfológica. Esta falta de congruencia entre datos morfológicos y bioquímicos ha sido también observada en otras especies de diferentes grupos de animales y vegetales (Turner, 1974; Avise et al., 1975; Kornfield y Koehn, 1975; King y Wilson, 1975; Mastenbrock et al., / 1981; Doebley y Goodman, 1984; etc).

Los estudios cromatográficos realizados por Palacios y Bravo (1981), / Naranjo et al. (1984) y Naranjo y Enus Zelger (1983), así como de electroforesis de proteínas seminales (Burgardt y Palacios, 1981, 1984; Burgardt, // 1982) mostraron, al igual que la evidencia aquí presentada, una gran afinidad bioquímica entre estas especies. Esta gran similitud molecular podría, por lo tanto, tener un significado real desde el punto de vista biológico y evolutivo.

Como se indicó previamente, las especies de esta Sección presentaron / una identidad genética equivalente a la que se esperaba para semi o subespecies. Para explicar esta alta afinidad podrían considerarse varias hipótesis: Hipótesis 1: La estrecha similitud puede ser debida a errores de muestreo: podría plantearse que el número de loci utilizados para estimar las distancias / o identidades genéticas sea poco elevado. No obstante, no hay razones biológicas para suponer que todas las especies de un grupo hayan alcanzado por azar / un grado similar de diferenciación genética.

Las similitudes bioquímicas observadas entre un gran número de variedades de especies de plantas, vertebrados e invertebrados no parece estar distribuida al azar sino que invariablemente está correlacionada con postulados de parentescos independientes derivados de datos morfológicos, fisiológicos, / ecológicos y zoogeográficos (Avise y Smith, 1974 a, b).

La evolución es un proceso gradual que envuelve cambios en las frecuencias génicas mediados por la selección natural, y el grado de diferenciación/genética entre un par de especies no necesita converger al mismo valor medio, pero si lo logra es debido a una variedad de factores, incluyendo el tiempo / de divergencia genética, el tamaño poblacional y parámetros ambientales. Por estas razones debería descartarse la posibilidad de que los valores de identidad obtenidos sean debidos a errores de muestreo.

Hipótesis 2: La gran similitud deriva en parte de la incapacidad de descubrir diferencias reales: Esto sería debida: a) degeneración del código genético, lo que implica que muchas sustituciones no alteran las secuencias de aminoácidos de los polipéptidos; b) muchas sustituciones no alteran la carga neta y // por lo tanto no son detectadas electroforéticamente; c) existe un limitado número de bandas distinguibles en el gel y muchas de ellas podrían mostrar una aparente homología en las distintas especies por tener igual movilidad, cuando realmente son isoenzimas diferentes. Todos estos hechos tenderían a exagerar el grado de similitud entre los taxones. No obstante, las mismas bases son aplicadas a todos los estudios de similitud genética basados en datos electroforéticos. A pesar de esto, generalmente las comparaciones interespecíficas, muestran menores índices de similitud genética que los observados en este trabajo.

Hipótesis 3: La estrecha similitud puede ser debida a presiones de selección/convergentes: esta hipótesis postula que la selección natural causa convergencia, produciendo las mismas frecuencias alélicas en muchos loci de linajes separados. Esto parece bastante improbable, porque las diferentes especies // han mostrado diferencias morfológicas y ecológicas, y probablemente han estado bajo diferentes presión de selección.

Hipótesis 4: La estrecha similitud genética es consecuencia de barreras reproductivas débiles: esta hipótesis se basaría en que: a) existe una extensa

hibridación en zonas de solapamiento. En estas regiones podría haber una tendencia a la "homogeneización" de las frecuencias alélicas, pero ésta no sería suficiente como para que las especies pierdan su identidad. Esta hibridación/ puede haber sido provocada por modificaciones en el terreno donde ellas convi-  
ven, causadas por la introducción de cultivares, creación de diques, tala /  
de bosques, introducción del ganado, grandes sequías, desborde de ríos, etc./  
Estos nuevos hábitat abiertos (Anderson, 1948, 1949), con grandes superficies  
de ambientes inestables y presencia de áreas superpuestas de diferentes espe-  
cies relacionadas, permiten que se produzcan híbridos y que ellos prosperen,/  
porque el ambiente se ha "hibridado" y existen nuevos nichos posibles de ser/  
ocupados. Esta situación ha sido observado por Morello et al. (1971). Estos /  
autores encontraron sobre la ruta Nacional 95 entre los arroyos Monte Lindo y  
Tatú Piré (Interfluvio Formoseño) abundantes morfohíbridos entre P.ruscifolia  
y P.hassleri, en cultivos abandonados hacía aproximadamente 7 a 9 años. El //  
80 % de toda esa región estaba prácticamente invadida por P.ruscifolia. Sin /  
embargo, en una pequeña zona ocupada por sistemas homeostáticos (Morello et al.,  
1971), es decir, sistemas donde no hay disturbios y la invasión por coloniza-  
doras es resistida, P.hassleri crecía pura sin hibridarse con P.ruscifolia./  
b) Hasta el momento se han obtenido pocos indicios de que existan mecanismos/  
de aislamiento reproductivo entre especies de esta Sección: i) por los datos/  
obtenidos en el presente estudio para el sistema GOT y también por resultados  
de estudios morfológicos (Naranjo y Enus Zeiger, 1983), P.caldenia parecería/  
no hibridarse con P.flexuosa ni P.alpataco. ii) Se ha demostrado una disminu-  
ción de la viabilidad del polen en individuos de origen híbrido entre P.ni-/  
gra x P.affinis debido tal vez a hibridez estructural críptica (Naranjo et al.,  
1984). iii) Las variaciones de las relaciones de intensidades observadas en-  
tre las especies e híbridos naturales para el sistema isoenzimático de ADH //  
previamente descritas, sugerirían una incipiente divergencia en los sistemas

de regulación génica, que podrían llevar con el tiempo a la inviabilidad de los híbridos. Sin embargo, hasta el presente no hay evidencias firmes de la existencia de una verdadera y eficaz barrera reproductiva entre tales entidades.

Dada la alta tasa de hibridación observada, esta hipótesis entonces no puede ser descartada.

Hipótesis 5: El genoma de las especies de la Sección Algarobia sería esencialmente dicotómico con respecto a la evolución.

La situación en estas especies, con grandes discrepancias entre los resultados obtenidos con diferentes técnicas (moleculares morfológicas) pueden compararse a la observada por Turner (1974) en peces del género Cyprinodon y // Avise et al. (1975) en Hesperoleucus y Lavinia, en los cuales también se encontró una considerable diferenciación ecológica y morfológica con poco cambio génico entre las especies. Turner (1974) propuso que en Cyprinodon el genoma sería esencialmente dicotómico con respecto a su evolución. Es decir, un grupo de genes evolucionaría más rápido que el otro, respondiendo tanto a factores de selección como estocásticos y que serían provocados por diferencias ecológicas y de hábitat. Este grupo, tanto en Cyprinodon (Turner, 1974) como en // Prosopis, incluiría aquellos genes que median la expresión morfológica junto con ciertos sistemas isoenzimáticos que fijaron alelos o genes distintos en diferentes especies (loci diagnósticos). El segundo grupo incluiría a la mayoría de los loci isoenzimáticos estudiados en estos trabajos. Estos genes corresponderían a grupos fuertemente coadaptados que responden a distintas condiciones ambientales eficientemente y cuya modificación no resultaría adaptativa. Turner (1974) propone además que la adaptación a amplias y frecuentes fluctuaciones en parámetros ambientales críticos sería el factor que demandaría esta muy fuerte coadaptación entre las enzimas de importantes procesos fi

siológicos, Estas fluctuaciones también son comunes en Prosopis sometidos con regularidad a inundaciones, sequías, incendios, etc.

Como corolario de esta hipótesis se desprendería que la especiación/ dentro de la Sección Algarobia no habría implicado cambios a nivel del genoma completo, sino de sólo una proporción del mismo.

A este respecto, Hubby y Throckmorton (1968), Selander y Johnson /// (1973), Ayala et al. (1974 b.), Cordeiro (1974), Smith-Cavalli (1976) y otros autores han concluido que la especiación no requeriría grandes cambios genéticos. Esto estaría de acuerdo con Templeton (1979) quien propone que la especiación vía principio del fundador no requeriría necesariamente la ocurrencia de una "revolución genética" (Mayr, 1954, 1970) sino que podría implicar sólo una proporción relativamente pequeña del genoma, por lo que propuso el término "transiliencia genética".

Estas dos últimas hipótesis (4 y 5) podrían explicar la falta de diferenciación genética detectable electroforéticamente entre estas especies, aunque se mantienen aún las incógnitas con respecto al nivel de la barrera de // aislamiento entre las mismas y la importancia relativa de los procesos postulados por tales hipótesis.

Con respecto a las especies de la Sección Strombocarpa, los índices / de identidad genética indicarían una estrecha similitud (Tabla 123), y, dado // que estas entidades son alopátridas, que existe hibridación en algunas zonas/ de contacto y que morfológicamente son muy semejantes (Burkart, 1976) tal vez sería más correcto denominar a estas entidades como subespecies o razas geo-/ gráficas.

A nivel de Sección, en este género, se observaron grandes diferencias moleculares, en coincidencia con las notables diferencias morfológicas encontradas por Burkart (1976); esto, sumado al hecho de no haberse encontrado híbridos interseccionales, indicaría una importante divergencia evolutiva en

tre las especies de ambas secciones,

Por otra parte, los estudios de los aceites de Prosopis (Madrñan /// Polo et al., 1976), mostraron una gran uniformidad en el contenido de ácidos / grasos entre las diferentes especies de la Sección Algarobia y Strombocarpa, / por lo cual estos autores sostienen que ambas secciones deben mantenerse dentro del género Prosopis.

Por lo tanto, podría pensarse que tal vez sería más apropiado elevar / las secciones a la categoría de subgénero (Hunziker, com. pers.).

Dentro de las secciones, no se pudo establecer a través de este estudio, una correspondencia entre los datos morfológicos y moleculares, puesto / que las relaciones de parentesco bioquímico se apartan en varios aspectos de / las propuestas por Burkart (1976).

En las especies de las diferentes secciones, como ya se discutió, no pa rece que haya habido muchos cambios del genotipo en términos de genes estructurales.

Es importante recordar que las isoenzimas analizadas representan una / pequeñísima parte del genoma y que este tipo de comparación de genes estructu rales no toman en consideración los posibles, y tal vez más importantes, cambios en los mecanismos regulatorios (Soulé, 1980). La importancia de tales mecanis mos fue obervada por Cordeiro (1974) en Drosophila, cuyos resultados indica ron que la divergencia evolutiva entre especies muy relacionadas está determi nada en gran parte por la evolución de sus sistemas integrados de regulación, / siendo pocos los cambios a nivel de genes estructurales.

Finalmente, los datos moleculares presentados en este trabajo apoya-// rían la hipótesis de Palaciosy Bravo (1981) de que estas entidades, biológica mente, equivaldrían a semi o subespecies, y la comunidad de estas semiespecies simpátridas constituiría un "singameón" (Grant, 1957, 1977, 1980). Este ha /

(Grant 1981?)

sido definido en términos modernos como "la suma total de especies o semiespecies ligadas frecuentemente u ocasionalmente por hibridaciones naturales. El singameón es la unidad más amplia que incluye individuos interfértiles de un grupo de especies que se hibridan. Generalmente, los hábitat que ocupan estas semiespecies son contiguos permitiendo contactos marginales y simpátridos y / además, las barreras ecológicas normalmente son rotas en muchos lugares debido a perturbaciones ambientales producidas por el hombre. Los componentes del Singameón son tratados generalmente como especies en la sistemática formal y por lo tanto los componentes son, usualmente, buenas especies taxonómicas".

Esta definición se ajusta muy estrechamente a la situación observada en las especies de la Sección Algarobia y el término ha sido utilizado para / otros grupos que presentan un comportamiento similar a Prosopis. Grant (1957) describió en el género Gilia, cuatro especies, las cuales son en muchos lugares simpátridas, se hibridan y sus híbridos son fértiles. Estos hechos al igual que en Prosopis hacen difícil reconocer a estas entidades como especies biológicas. Este autor propone para Gilia la siguiente hipótesis: G. latiflora, G. cana y G. tenuiflora habrían alcanzado a completar escasamente la especiación primaria (divergencia), seguida de hibridación extensiva en varias // combinaciones. La hibridación habría alcanzado a evitar que las poblaciones // originales extremas persistan como especies netamente definidas, así, no habrían completado el proceso de especiación secundaria (aislamiento reproductivo). Los constituyentes principales poseen entonces algunas de las características de subespecies de modo que ellas pueden mutuamente reemplazarse geográficamente, presentar intergradación en zonas de contacto y retener cierto grado de interfertilidad. También poseen algunas características de especies, como lo manifiestan en las áreas de contactos simpátridos marginales y en un / grado de divergencia genética y morfológica, comparable a los de cualquier // otra especie. En la Sección Algarobia el singameón ha desarrollado una vasta

red de semiespecies compuesta de numerosas especies taxonómicas y que se extienden en grandes áreas geográficas. A pesar de que las interacciones reproductivas de este singameón, lo hacen comportarse como una especie biológica, es decir, un conjunto de individuos interfértiles, difiere de ella en que su estructura interna es más compleja. En particular, muy probablemente el complejo constituido por las semiespecies de la Sección Algarobia sería lo suficientemente estable como para mantenerse en tal estado a pesar de la simpatría, hecho que no sería de esperar en el caso de subespecies de una especie biológica normal.

RESUMEN

En este trabajo se estudió la variación alozímica de siete sistemas isoenzimáticos en poblaciones de especies pertenecientes a dos Secciones del género Prosopis. Estas son: Secc. Algarobia, Serie Ruscifoliae: P. ruscifolia, P. hassleri, P. vinalillo; Serie Chilensis: P. nigra, P. alba, P. flexuosa, P. caldenia, P. alpataco, y de la Sección Strombocarpa, Serie Strombocarpaceae: P. strombulífera y P. reptans.

Se estudiaron también presuntos híbridos interespecíficos o derivados híbridos de la Secc. Algarobia, con el objeto de i) utilizar los marcadores alozímicos propios de cada especie en la identificación certera de los mismos, ii) determinar la hipótesis más probable del mecanismo genético involucrado en la producción de las isoenzimas.

Se comparó el grado de polimorfismo de cada sistema isoenzimático en Prosopis con aquéllos hallados por otros autores en otros organismos, tratando de aportar datos que permitan ampliar el conocimiento que se tiene acerca de las relaciones entre el grado de polimorfismo que presentan las enzimas según la función que cumplen en las diferentes rutas metabólicas y la estrategia adaptativa de las especies.

Se analizaron por medio de la técnica de electroforesis horizontal / en geles de poliacrilamida y almidón los siguientes sistemas isoenzimáticos: Alcohol Dehidrogenasa, Glutamato Oxalacetato Transaminasa, Esterasa, Peroxidasa, Aminopeptidasa, 6-Fosfogluconato Dehidrogenasa y Superóxido Dismutasa. Se determinó el número de alelos y se calcularon las frecuencias alélicas // (Tablas 119 y 120), para determinar si las frecuencias genotípicas de dichos loci se ajustaban a un equilibrio de Hardy-Weinberg (Tablas 2-118). Dentro de cada sección se calcularon además para todos los pares de poblaciones, los

Índices de identidad genética media y distancia genética (Nei, 1972) (Tablas 123, 124). Finalmente en base a la identidad genética, utilizando el método de análisis de agrupamiento de medias no ponderadas (UPGMA) se construyó el dendograma correspondiente para la Secc. Algarobia (Fig. 17).

Las entidades estudiadas pertenecientes a la Secc. Algarobia, presentan diferencias morfológicas que permiten considerarlas especies (Burkart, 1976). En el presente trabajo se encontró que el grado de similitud molecular entre ellas es tan alto como lo que se esperaría para semi o incluso subespecies (Tablas 123 y 124). Además las afinidades relativas entre especies obtenidas a partir de los datos enzimáticos presentan discrepancias con la clasificación basada en datos morfológicos. Tales discrepancias podrían deberse a una tasa de evolución diferencial entre los loci relacionados con caracteres exofenotípicos y los que codifican para diferentes enzimas.

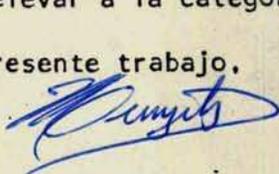
La alta similitud genética revela que los taxones se han diferenciado poco genéticamente, lo cual coincide con la aparente debilidad de las barreras de aislamiento reproductivo. Las únicas evidencias enzimáticas sobre la existencia de posibles mecanismos de aislamiento se refieren a que: 1) en algunos individuos de P. nigra y P. ruscifolia, las intensidades de coloración relativa de las bandas de ADH se apartaban de las esperadas, hecho que sugeriría una incipiente divergencia génica entre estas especies y P. alba y P. hassleri (Figura 2 A, D). 2) La observación de que si bien en zonas de simpatria el polen de P. caldenia podría fecundar a P. alpataco y P. flexuosa dando semillas híbridas (Fig, 5 D), no se encontraron semillas provenientes de P. caldenia con patrones enzimáticos híbridos. Esto coincide con la posición aislada de P. caldenia en el fenograma donde se encuentra relativamente más alejada de las demás especies de esta Sección (Fig. 17).

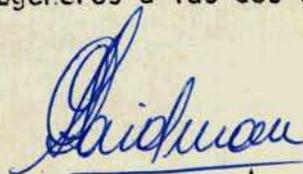
Los valores de  $P$  y  $\bar{H}$  de estas especies (Tabla 121) son semejantes/ a los observados en otras leñosas ( $\bar{P} = 42\%$ ,  $\bar{H} = 0.168$ ). La especie más Invasora, P. ruscifolia, resultó ser la menos variable, lo que indicaría que su estrategia implicaría poca variabilidad genética, pero una gran plasticidad que le permitiría adaptarse eficientemente a los ambientes que coloniza.

La elevada afinidad enzimática y la falta de barreras reproductivas eficientes entre estas especies taxonómicas simpátricas, apoyaría la hipótesis de que ellas serían desde el punto de vista biológico semiespecies y que el conjunto de las mismas constituiría un singameón. Este, a diferencia de una especie corriente, poseería una estructura interna lo suficientemente estable para mantenerse en tal estado a pesar de la simpatria/ y de la hibridación.

Las especies de la Sec. Strombocarpa son alopátricas y muy semejantes morfológicamente (Burkart, 1976), e isoenzimáticamente también presentaron una estrecha similitud (Tabla 124). Por estas razones tal vez sería más adecuado considerar a estas entidades como subespecies. Los valores de  $P$  y  $\bar{H}$  fueron bastante más bajos que los observados en otras leñosas (Tabla 122) ( $\bar{P}=13\%$ ,  $\bar{H}=0.044$ ), incluyendo a las pertenecientes a la Sec. Algarobia. Esto indicaría que los sistemas reproductivos y/o las estrategias adaptativas podrían ser diferentes en las dos Secciones.

Las diferencias electroforéticas entre las especies pertenecientes a las dos Secciones son de tal magnitud que no existe similitud entre las enzimas estudiadas (excepción hecha de SOD). Esto, sumado al hecho de que no se producirían híbridos interseccionales (Hunziker et al., 1977) y a las grandes diferencias morfológicas (Burkart, 1976), sugieren que tal vez sea más adecuado elevar a la categoría de subgéneros a las dos Secciones/ estudiadas en el presente trabajo.





REFERENCIAS

- Allard, R.W.; G.R. Babbel; M.T. Clegg; A.L. Kahler. 1972. Evidence for coadaptation in Ayena barbata. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 69: 3043-3048
- Anderson, E. 1948. Hybridization of the habitat. Evolution 2: 1-9
- Anderson, E. 1949. Introgressive Hybridization. John Wiley and Sons, Inc. New York, Chapman and Hall, Limited, London.
- Avery, D.T.; C.M. MacLeod; M. McCarty. 1944. Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. Induction of transformation by a deoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus type III. Jour. Exp. Med. 79:137-158.
- Ayala, J. C. 1976. Diferenciación genética durante la especiación. En: Ayala, J.F. (ed.), Evolución Molecular. Ediciones Omega: 110-127
- Ayala, J.C.; M. H. Smith. 1974a. Biochemical genetics of sunfish. I geographic variation and subspecific intergradation in the blue gill, Lepomis macrochirus. Evolution, 28:42-56
- Ayala, J. C.; M. H. Smith. 1974b. Biochemical genetics of sunfish, II genetic similarity between hybridizing species. Amer. Natur. 108: 458-478
- Ayala, J. C.; J. J. Smith; F. J. Ayala. 1975. Adaptive differentiation with little genic change between two native California minnows. Evolution, 29: 411-426.
- Ayala, C.J.; Ch.F. Aquadro; J. C. Patton. 1981. Evolutionary genetics of birds. V genetic distances within Mimidae (Mimic thrushes) and Vireonidae (Vireos). Biochem. Genet., 20: 95-104.
- Ayala, F.J.; M. L. Tracey; L. G. Barr; J. G. Ehrenfeld. 1974a. Genetic and reproductive differentiation of the subspecies Drosophila equinoxialis caribbensis. Evolution, 28: 24-41
- Ayala, F. J.; M. L. Tracey; L. G. Barr; J. F. Mc.Donald; S. Perez-Salas. 1974b.

- Genetic variation in natural poblations of five *Drosophila* species and the hypothesis of the selective neutrality of protein polymorphisms. *Genetics*, 77: 343-384.
- Ayala, F.J.; M.L. Tracey; D. Hedgecock; R. C. Richmond. 1974c. Genetic differentiation during the speciation process in *Drosophila*. *Evolution*, 28: 576-592.
- Babbel, G. R.; R. K. Selander. 1974. Genetic variability in edaphically restricted and widespread plant species. *Evolution*, 28: 619-630.
- Bassiri, A. 1976. Barley cultivar identification by use of isozyme electrophoretic patterns. *Canad. J. Plant Sci.*, 56: 1-6
- Baum, J. A.; J. G. Scandalios. 1979. Developmental expression and intracellular localization of superoxide dismutases in maize. *Differentiation*, 13: 133-140
- Beadle, G. W.; E. L. Tatum. 1941. Genetic control of biochemical reactions in *Neurospora*. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 27: 499-506
- Bentham, G. 1875. Revision of the suborder Mimoseae. citado en Johnston M. C. 1962. The North American Mesquites *Prosopis* Sect. *Algarobia* (Leguminosae). *Brittonia*, 14: 72-90.
- Benzer, S. 1955. Fine structure of a genetic region in bacteriophage. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, 41: 344-354.
- Benzer, S. 1959. On the topology of the genetic fine structure. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, 45: 1607-1620.
- Benzer, S. 1961. On the topology of the genetic fine structure. *Proc. Nat. Acad. Sci., USA.*, 47: 403-415.
- Berger, E. 1971. A temporal survey of allelic variation in natural and laboratory populations of *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 67: 121-136.
- Bernstein, S. C.; L. H. Throckmorton; J. L. Hubby. 1973. Still more

- genetic variability in natural populations. Proc. Natl. Acad. USA.,  
70: 3928-3931.
- Bosbach, K.; H. H. Münster. 1981. Biosystematic studies on Capsella bursa-  
pastoris (Brassicaceae). Enzyme polymorphism in natural populations  
Pl.Syst. Evol.,137: 73-94
- Boyer, S. H.; A. N. Noyes; C. F. Timmons; R. A. Young. 1972. Primate  
hemoglobins polymorphisms and evolutionary patterns. J. Human Evol.,  
1: 515-543
- Brewer, G. R.; Ch. Sing. 1970. An introduction to isozyme technique . Academic  
Press-New York and London.
- Brown, A. H. D.; D. R. Marshall. 1981. Evolutionary changes accompanying  
colonization in plants. en Scudder, G.C.E.; Reveal, J.L.. Evolution  
today . Proceeding of the second international congress of systematic  
and evolutionary biology: 351-363
- Burdon, J.J.; D. R. Marshall; R. H. Groves. 1980. Isozyme variation in  
Chondrilla juncea L. in Australia. Aust. J. Bot., 28: 193-198.
- Burghardt, A. D. 1982. Estudios electroforéticos en el género Prosopis  
(Leguminosae), XIII. Congr. Arg. de Genética : 74
- Burghardt, A. D.; R. A. Palacios. 1981. Caracterización electroforética de  
algunas especies de Prosopis (Leguminosae). XII Congr. Arg. de  
Genética: 11
- Burghardt, A. D.; R.A. Palacios. 1984. Variabilidad electroforética en  
cuatro especies de Prosopis (Leguminosae). XV Congr. Arg. de Geneti  
ca: 65
- Burkart, A. 1937. Estudios morfológicos y etológicos en el género Prosopis  
Darwiniana, 3: 27-47
- Burkart, A. 1940. Una monografía del género Prosopis (Leguminosae)  
Darwiniana, 4: 27-47
- Burkart, A. 1952. Las leguminosas argentinas, silvestres y cultivadas.

- Acme. Agency, (2°ed.) Bs. As. 126-143
- Burkart. A. 1976. A monograph of the genus Prosopis (Leguminosae subfam. Mimosoideae ). Journal of the Arnold Arboretum., 57 (3): 219-249; (4): 450-525.
- Campbell, R. S. 1929. Vegetative Succession in the Prosopis sand dunes of Southern New Mexico. Ecology, 10: 392-398.
- Carman, N. J. 1973. Systematic and ecological investigations in the genus Prosopis (Mimosaceae), emphasizing the natural products chemistry. Diss. Fac. Univ. Texas, Austin.
- Clegg, M. T.; R. W. Allard, 1972. Patterns of genetic differentiation in the slender wild oat species, Avéna barbata. Proc. Natl. Acad. USA., 69: 1820-1824.
- Conklin, M. E.; H. H. Smith. 1971. Peroxidase isozymes: A measure of molecular variation in ten herbaceous species of Datura. Amer. J. Bot., 58: 688-696
- Cordeiro, A. R. 1974. Variabilidade e regulação genética nos processos evolutivos. Tese para concurso à professor titular. Departamento de genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- Crick, F. H. C. 1958. On protein synthesis. Symp. Soc. Exp. Biol., 12 : 138-163.
- Crick, F. H. C.; L. Barnett; S. Brenner; R. J. Watts Tobin, 1961. General nature of the genetic code for proteins. Nature, 192: 1227-1232.
- Crisci, J. V.; M. F. López Armengol. 1983. Introducción a la teoría y práctica de la taxonomía numérica. Org. Est. Amer. Whashington D.C.
- Chao, S. E.; J. E. Scandalios. 1972. Developmentally dependent expression of tissue specific amylases in maize. Molec. Gen. Genetics., 115: 1-9
- Chapman, V. M.; F. H. Ruddle. 1972. Glutamate oxalacetate transaminase (GOT) genetics in the mouse: Polymorphisms of Got-1. Genetics, 70: 299-305

- Cherry, J. P.; F. R. H. Katterman. 1971. Nonspecific esterase isozyme polymorphism in natural populations of Gossypium thurberi. *Phytochemistry*, 10: 141-145
- Darwin, Ch. 1859. On the origin of species. A facsimile of the first edition with an introduction by Ernest Mayr. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts. 1966.
- Davidson, R. G.; J.A. Cortner; M. C. Rattazzi; F. H. Ruddle; H. A. Lubs. 1970. Genetic polymorphisms of human mitochondrial glutamate oxalacetate transaminase. *Science*, 169:391-392
- De Jong, D. W. 1972. Detergent extraction of enzymes from tobacco leaves varying in maturity. *Plant Physiol.*, 50: 733-737.
- Dobzhansky, Th. 1951. Genetics and the origin of species. (3<sup>rd</sup> ed. ). Columbia University Press. New York.
- Dobzhansky, Th.; F. J. Ayala. 1973. Temporal frequency changes of enzymes and chromosomal polymorphisms in natural populations of Drosophila. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, 70: 680-683.
- Doebley, J.F.; M.M. Goodman. 1984. Isoenzymatic variation in Zea (Gramineae). *Syst. Bot.*, 9:203-218.
- Edwards, Y. H.; D. A. Hopkinson; H. Harris. 1978. Dissociation of "hybrid" isozymes on electrophoresis. *Nature*, 271: 84-87
- Ellstrand, N. C.; J. M. Lee; K. W. Foster. 1983. Alcohol dehydrogenase isozymes in grain sorghum (Sorghum bicolor). Evidence for a gene duplication. *Biochem. Genet.*, 21: 147-154.
- Endo Toru . 1973. Isozyme loci and strategy of differentiation in plants ( A review ). *Seiken Zihō*, 24: 89-104.
- Felker, P. 1983. Methods for acquisition, storage and evaluation of leguminous tree germplasm. *Prociencia*, 6: 105-110.
- Felker, P.; R. Bandurski, 1977. Protein and amino acid composition of the legume seeds. *J. Sci. Fd. Agric.*, 28:791-797

- Felker, P.; R. Bandurski. 1979. Uses and potential uses of leguminous trees for minimal energy input agriculture. *Economic Botany*, 33:172-184.
- Ferris, S. D.; G. S. Whitt. 1978. Genetic and molecular analysis of nonrandom dimer assembly of the creatine kinase isozymes of fishes. *Biochem. Genet.*, 16: 811-829 .
- Fincham, J. R. S. 1972. Heterozygous advantage as a likely general basis for enzyme polymorphisms. *Heredity*, 28: 387-391.
- Gardiner, M. G.; R. Cleland. 1974. Peroxidase isoenzymes of the Avena coleoptile. *Phytochem.* 13: 1707-1711.
- Gillespie, J. H.; K. Kojima. 1968. The degree of polymorphisms in enzymes involved in energy production compared to that in nonspecific enzymes in two Drosophila ananassae populations. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, 61: 582-585.
- Gillespie, J. H.; C. H. Langley. 1974. A general model to account for enzyme variation in natural populations, *Genetics*, 76: 837-884.
- Gómez, I.; I. Malvarez; J. Morello; G. Albertella; G. Goldstein. 1973. Caracterización estructural de poblaciones del vinal (Prosopis ruscifolia Gris) Serie 2, *Biología y producción vegetal*, INTA 10: 143-150.
- Gottlieb, L. D. 1973a. Enzyme differentiation and phylogeny in Clarkia franciscana, C. rubicunda and C. amoena. *Evolution*, 27: 205-214.
- Gottlieb, L. D. 1973b. Genetic control of glutamate oxalacetate transaminase isozymes in the diploid plant Stephanomeria exigua and its allotetraploid derivative. *Biochem. Genet.*, 9: 97-107.
- Gottlieb, L. D. 1973c. Enzyme differentiation, sympatric speciation, and the origin of a diploid species of Stephanomeria. *Amer. J. Bot.*, 60: 545-553.
- Gottlieb, L. D. 1974a. Genetic confirmation of the origin of Clarkia ! -

- lingulata. Evolution, 28: 244-250.
- Gottlieb, L. D. 1974b. Gene duplication and fixed heterozygosity for alcohol dehydrogenase in the diploid plant Clarkia franciscana. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 71: 1816-1818.
- Gottlieb, L. D. 1975. Allelic diversity in the outcrossing annual plant Stephanomeria exigua ssp. carotifera (Compositae). Evolution, 29: 213-225.
- Gottlieb, L. D. 1977. Electrophoretic evidence and plant systematics. Ann. Missouri Bot. Gard., 64: 161-180.
- Gottlieb, L. D. 1982. Conservation and duplication of isozymes in plants. Science, 216: 373-380.
- Grant, V. 1957. The plant species in theory and practice. En: Mayr, E. (ed.). The species problem. American Association for the Advancement of Science. Publ. N° 50: 39-80. Washington D. C.
- Grant, V. 1977. Organismic Evolution. W. H. Freeman & Co. San Francisco.
- Grant, V. 1981. Plant Speciation. Columbia University Press. New York.
- Grell, E. H.; K. B. Jacobson; J. B. Murphy 1965. Alcohol dehydrogenase in D. melanogaster isozymes and genetic variants. Science, 149: 80-82.
- Gurumurti, K.; K. K. Nanda 1974. Changes in peroxidase isoenzymes of Phaseolus mungo hypocotyl cuttings during rooting. Phytochem., 13: 1089-1093.
- Habit, M. A.; D. T. Contreras; R. H. González. 1981. Prosopis tamarugo: arbusto forrajero para zonas áridas. Estudio FAO: Producción y Protección Vegetal., 25: 1-133. Org. Nac. Unidas para la Agric. y la Alimentación. Roma.
- Hadacova', V. 1974. Glucose-6-phosphate dehydrogenase isoenzymes in root growth zones of Vicia faba. Biologia Plantarum, 16: 199-203.
- Hall, B. D. and S. Spiegelman. 1961. Sequence complementary of T<sub>2</sub> DNA and

- T<sub>2</sub> specific RNA. Proc. Nat. Acad. Sci., 47: 137-146.
- Hall, W. P.; R. K., Selander. 1973. Hybridization of karyotypically differentiated populations in the Sceloporus grammicus complex (Iguanidae). Evolution, 27: 226-242.
- Hamill, D. E.; Brewbaker, J. L. 1969. Isoenzyme polymorphism in flowering plants IV The peroxidase isoenzymes of maize (Zea mays). Physiol. Plant., 22: 945-958.
- Hamrick, J. L. 1979. Genetic variation and longevity. En: Solbrig, O. T.; Jain, S.; Johnson, G. B.; Raven, P. H. (eds.). Topics in Plant Population Biology. Columbia University Press, New York, 85-113.
- Hamrick, J. L.; R. W. Allard. 1972. Microgeographical variation in allozyme frequencies in Avena barbata. Proc. Nat. Acad. Sci. USA., 69: 2100-2104.
- Hamrick, J. L.; Y. B. Linhart; J. B. Mitton. 1979. Relationships between life history characteristics and electrophoretically detectable genetic variation in plants. Ann. Rev. Ecol. Syst., 10: 173-200.
- Hancock, J. F.; E. Lansing. 1982. Alcohol dehydrogenase isozymes in Gossypium hirsutum and its putative diploid progenitors: The biochemical consequences of enzyme multiplicity. Pl. Syst. Evol., 140: 141-149.
- Hardy, G. H. 1908. Mendelian proportions in a mixed population. Science., 28: 49-50.
- Hart, G. 1970. Evidence for triplicate genes for alcohol dehydrogenase in hexaploid wheat. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 66: 1136-1141.
- Hauman, L. 1947a. Parque chaqueño. En: Hauman, L.; Burkart, A.; Parodi, L. R. Cabrera, A. L. (eds.). Geografía de la República Argentina. Tomo 8. "La vegetación argentina". Sociedad Argentina de Estudios Geográficos

(GAEA): 69-86

- Hauman, L. 1947b. Provincia del "Monte" ( o del espinal ). En: Hauman, L; Burkart, A; Parodi, L. R., Cabrera, A. L., (eds.). "La vegetación argentina". Sociedad Argentina de Estudios Geográficos (GAEA): 208-244.
- Hayward, M. D.; J. B. Hacker. 1980. Genetic control of some esterase isozymes of Digitaria species and their utility in the identification of hybrids. *Euphytica*, 29: 347-356.
- Holmes, R. S.; C. J. Masters. 1967. The developmental multiplicity and isoenzyme status ofavian esterases. *Biochem. Biophys. Acta*, 132: 379-399.
- Hubby, J. L.; R. C. Lewontin. 1966. A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations. I. The number of alleles at different loci in Drosophila pseudoobscura. *Genetics*, 54: 577-594.
- Hubby, J. L.; L. H. Throckmorton. 1968. Protein differences in Drosophila . IV, A study of sibling species. *Amer. Natur.*, 102: 193-205.
- Humphrey, R. R. 1958. The desert grassland. *Botan. Rev.*, 24: 193-252.
- Hunt, W. G.; R. K. Selander. 1973. Biochemical genetics of hybridization in european house mice. *Heredity*, 31: 11-33.
- Hunter, L.; C. L. Markert. 1957. Histochemical demonstration of enzymes separated by zone electrophoresis in starch gels. *Science*, 125: 1294-1295.
- Hunziker, J. H.; L. Poggio; C. A. Naranjo; R. A. Palacios; A. B. Andrada. 1975. Cytogenetics of some species and natural hybrids in Prosopis (Leguminosae). *Can. J. Genet. Cytol.*, 17: 253-262.
- Hunziker, J. H.; C. A. Naranjo; R. A. Palacios; L. Poggio. 1977. Chromosomal cytology and hybridization. En: Simpson, B.B. (ed.).

- Mesquite. Its biology in two desert ecosystems. US/IBP. Series 4  
Ch. 3. " Patterns of variation " Dowden, Hutchinson and Ross,  
Inc. : 56-59.
- Hunziker, J. H. ; B. A. Schaal. 1983. Isozymes variation in diploid  
tropical and octoploid subtropical temperate species of Bulnesia  
J. Heredity, 74: 358-360.
- Huxley, P. A. 1983. The role of trees in agroforestry: Some comments. En:  
Huxley, P. A. (ed.). Plant research and agroforestry. Internatl.  
Council for Research in Agroforestry (ICRAF). Nairobi. Kenia.
- Hvid, S.; G. Nielsen. 1977. Esterase isoenzyme variants in barley.  
Hereditas, 87: 155-162.
- IUPAC- IUB. 1971. Commission on biological nomenclature 1971. The nomenclature  
of multiple molecular forms of enzymes recommendations. Arch. Biochem.  
Biophys., 147: 1-3.
- IUPAC-IUB. 1979. Enzyme nomenclature. Recommendations (1978) of the  
nomenclature committee of the international union of biochemistry.  
New York. International Union of Biochemistry. Academic Press, Inc.
- Johnson, F. M.; C. Denniston. 1964. Genetic variation of alcohol dehydrogenase  
in D. melanogaster. Nature, 204: 906-907.
- Johnson, F. M.; R. H. Richardson; M. P. Kambysellis 1968. Isozyme variabil-  
ity in species of the genus Drosophila. III. Qualitative comparison  
of the esterases of D. aldrichi and D. mulleri. Biochem. Genet., 1:  
239-247.
- Johnson, G. B. 1974. Enzyme polymorphism and metabolism. Science, 184: 28-37.
- Johnson, G. B. 1976. Hidden alleles at the alpha-glycerophosphate dehydro-  
genase locus in Colias butterflies. Genetics, 83: 149-167.

- Johnson, G. B. 1979. Enzyme polymorphism: Genetic variation in the physiological phenotype. En: Solbrig, O.; Jaim, S.; Johnson, G.; Raven, P. (eds.). Topics in plant population biology. Columbia University Press, New York.
- Johnson, W.; R. K. Selander 1971. Kangaroo rats (Genus Dipodomys). Syst. Zool., 20: 377-412.
- Johnston, M. C. 1962. The North American mesquite Prosopis , Sect. Algarobia (Leguminosae). Brittonia, 14: 72-90
- Kimura, M. 1979. The neutral theory of molecular evolution. Scientific American, 241: 94-104.
- Kimura, M. 1983. The neutral theory of molecular evolution. En: Nei, M.; Koehn, R. K. (eds.). Evolution of genes and proteins. Massachusetts, Sinauer Associates, Inc.: 208-233.
- Kimura, M.; T. Ohta 1971. Protein polymorphism as a phase of molecular evolution. Nature, 229: 467-469.
- King, J. L.; T. H. Jukes 1969. Non- Darwinian evolution. Science, 164: 788-797.
- King, M. C.; A. C. Wilson 1975. Evolution at two levels. Molecular similarities and biological differences between humans and chimpanzees. Science, 188: 107-116.
- Koehn, R. K.; D. I. Rasmussen. 1967. Polymorphic and monomorphic serum esterase heterogeneity in catostomid fish populations. Biochem. Genet., 1: 131-144.
- Koehn, R. K.; J. B. Mitton 1972. Population genetics of marine pelecypods.. I. Ecological heterogeneity and evolutionary strategy at an enzyme locus. Amer. Natur., 106: 47-56.
- Koehn, R. K.; R. Milkman; J. B. Mitton. 1976. Population genetics of marine

- pelecypods. IV. Selection, migration and genetic differentiation in the blue mussel, Mytilus edulis. *Evolution*, 30: 2-32.
- Koehn, R. K.; B. L. Bayne; M. N. Moore; J. F. Siebenaller 1980a. Salinity related physiological and genetic differences between populations of Mytilus edulis. *Biol. J. Linnean Soc.*, 14: 319-334.
- Koehn, R. K.; J. G. Halland; A. J. Zera 1980b. Parallel variation of genotype dependent aminopeptidase. I. Activity between Mytilus edulis and Mercenaria mercenaria. *Marine Biol. Letters*, 1: 245-253.
- Koehn, R. K.; R. I. E. Newell; F. Immermann 1980c. Maintenance of an aminopeptidase allele frequency cline by natural selection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77: 5385-5389.
- Kornfield, I. L.; R. K. Koehn 1975. Genetic variation and speciation in new world cichlids. *Evolution*, 29: 427-437
- Korochkim, L. I.; E. S. Belyaeva; N. M. Matveeva; B. A. Kuzin; O. L. Serov 1976. Genetics of esterases in Drosophila. IV. Slow migrating S-esterase in Drosophila of the virilis group. *Biochem., Genet.*, 14: 161-182.
- Laurie-Ahlberg, C. C. 1982. Genetic, ontogenetic and tissue-specific variation of dipeptidases in Drosophila melanogaster. *Biochem. Genet.*, 20: 407-424.
- Leakey, R. B.; F. T. Last 1980. Biology and potential of Prosopis species in arid environments, with particular reference to P. cineraria. *Journ. of Arid Environments*, 3: 9-24.
- Lehninger, A. L. 1972. *Bioquímica*. Ediciones Omega. Barcelona.
- Leung, E. S.; L. E. Haley 1974. The ontogeny of phosphogluconate dehydrogenase and glucose 6-phosphate dehydrogenase in Japanese quails and chicken quail hybrids. *Biochem. Genet.*, 11: 221-230.

- Levy, M.; D. A. Levin 1975. Genetic heterozygosity and variation in permanent translocation heterozygotes of the Oenothera biennis complex. *Bochem. Genet.*, 13: 487-500.
- Lewontin, R. C. 1974. The genetic basis of evolutionary change. Columbia Univ. Press, New York.
- Lewontin, R. C.; J. L. Hubby 1966. A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations. II. Amount of variation and degree of heterozygosity in natural populations of Drosophila pseudoobscura, *Genetics*, 54: 595-609
- Lumsden, J.; D. O. Hall 1975. Superoxide dismutase in photosynthetic organisms provides an evolutionary hypothesis. *Nature*, 257: 670-672.
- Lundkvist, K.; D. Rudin 1977. Genetic variation in eleven populations of Picea abies as determined by isozyme analysis. *Hereditas*, 85: 67-74
- MacDonald, T.; J. L. Brewbaker 1972a. Isoenzyme polymorphism in flowering plants. VIII. Genetic control and dimeric nature of transaminase hybrid maize isoenzymes. *J. Hered.*, 63: 11-14.
- MacDonald, T.; J. L. Brewbaker 1972b. Isozyme polymorphism in flowering plants. V. The isoesterases of maize: tissue and substrate specificities, and responses to chemical inhibitors. *Hawaii Agr. Expt. Station Technical Bull.* N°89.
- Madriñan Polo, C.; J. H. Hunziker; P. Cattaneo 1976. Aceites de semilla de especies de Prosopis y Prosopidastrum (Leguminosae). *Anales Asoc. Quim. Argentina*, 64: 127-138.
- Markert, C. L.; F. Moller 1959. Multiple forms of enzymes tissue ontogenetic

- and species patterns. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 45: 753-763.
- Marshall, D. R.; H. D. Brown 1975. The charge state model of protein polymorphism in natural populations. J. Mol. Evol., 6: 149-163.
- Mastenbrock, I.; Ch. E. Cohen; M. de West 1981. Seed protein and seedling isozyme patterns of Zea mays and its closest relatives. Biochem. Syst. and Ecol., 9: 179-183.
- Mayr, E. 1954. Change of genetic environment and evolution. En: Huxley, J.; Hardy, A. C.; Ford, E. B. (eds.). Evolution as a process. Allen and Unwin Ltd. London: 157-180.
- Mayr, E. 1970. Populations, species, and evolution. The Belknap Press of Harvard University. Cambridge. Massachusetts.
- McCord, J. M.; B.B. Keele, Jr.; I. Fridovich. 1971. An enzyme based theory of obligate anaerobiosis: The physiological function of superoxide dismutase. Proc. Nat. Acad. Sci. USA., 68: 1024-1027.
- McCown, B. H.; T. C. Hall; G. E. Beck 1969. Plant leaf and stem proteins. II. Isozymes and environmental change. Plant Physiol., 44: 210-216
- McCune, D. C. 1961. Multiple peroxidases in corn. Ann. N. Y. Acad. Sci., 94: 723-730.
- McNeill, J. 1976. The taxonomy and evolution of weeds. Weed Res., 16: 399-413.
- Mendel, G. 1865. Versuche über planzenhybriden. Verh. des naturf. Vereines in Brum (Abhandlungen), 4: 3-47.
- Meyerhof, P. G.; L. E. Haley 1975. Ontogeny of lactate dehydrogenase isozymes in chicken-quail hybrid embryos. Biochem. Genet., 13: 7-18.

- Morello, J. 1951. El bosque de algarrobo y la estepa de jarilla en el valle de Santa María (Provincia de Tucumán). *Darwiniana*, 9: 315-347.
- Morello, J. 1970. Modelo de relaciones entre pastizales y leñosas colonizadoras en el Chaco Argentino (Plan ecología, difusión y control del vinal). *IDIA*, 276: 31-51.
- Morello, J.; J. Adamoli 1974. Las grandes unidades de vegetación y ambiente del Chaco Argentino, 2ª parte: Vegetación y ambiente de la provincia del Chaco. Serie Fitogeográfica 13. INTA.
- Morello, J.; N. Crudeli; M. Saraceno. 1971. Los vinalares de Formosa (Rep. Arg.). La colonizadora leñosa Prosopis ruscifolia Gris. Serie Fitogeográfica 11. INTA.
- Morgan, T. H. 1911. An attempt to analyze the constitution of the chromosomes on the basis of sex-limited inheritance in Drosophila. *J. Exptl. Zool.*, 11: 365-413.
- Morton, N.; J. Crow; H. J. Müller 1956. An estimate of the mutational damage in man from data on consanguineous marriages. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, 42: 855-863.
- Müller, H. J. 1950. Our load of mutations. *Amer. J. Hum. Genet.*, 2: 111-176. (citado en Lewontin, 1974)
- Müller-Starck, G.; A. Huttermann 1981. Aminopeptidases in seeds of Picea abies (L) Karst: Characterization of leucine-aminopeptidase by molecular properties and inhibitors. *Biochem. Genet.*, 19: 1247-1259
- Nakai, Y.; K. Tsunewaki 1971. Isozyme variations in Aegilops and Triticum. I. Esterase isozymes in Aegilops studies using the gel isoelectrofocusing method. *Jap. J. Genet.*, 46: 321-336.
- Nakai, Y. 1977. Variations of esterases isozymes and some soluble proteins in diploids and their induced autotetraploids in plants. *Jap. J. Genet.*, 52: 171

181.

- Naranjo, C. A.; S. Enus Zeiger 1983. Cromatografía de fenoles y morfología en especies e híbridos de Prosopis de La Pampa. XIX Jornadas Arg. de Botánica: 32.
- Naranjo, C. A.; L. Poggio; S. Enus Zeiger 1984. Phenol chromatography, morphology and cytogenetics in three species and natural hybrids of Prosopis (Leguminosae, Mimosoideae). Pl. Syst. Evol., 144: 257-276.
- Nei, M. 1972. Genetic distance between populations. Amer. Natur., 106: 283-292.
- Nei, M. 1975. Molecular population genetics and evolution. North-Holland/American. Elsevier. Amsterdam, Oxford New York.
- Nei, M.; T. Maruyama; R. Chakraborty 1975. The bottleneck effect and genetic variability in populations. Evolution, 29: 1-10.
- Nirenberg, M. W.; J. H. Matthei 1961. The dependence of cell free protein synthesis in the E. coli upon naturally occurring or synthetic polyribonucleotides. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 47: 1588-1602.
- Ohno, S. 1970. Evolution by gene duplication. Springer-Verlag New York. Heidelberg Berlin.
- Ott, L. A.; J. Scandalios 1976. Genetically defined peptidases of maize, I. Biochemical characterization of allelic and nonallelic forms. Biochem. Genet., 14: 619-634.
- Palacios, R. A.; L. D. Bravo 1974. Estudios morfológicos de las semillas de algunos "Prosopis" del nordeste Argentino. Darwiniana, 18: 437-452.
- Palacios, R. A.; L. D. Bravo 1981. Hibridación natural en Prosopis (Leguminosae) en la región chaqueña argentina. Evidencias morfológicas y cromatográficas. Darwiniana, 23: 3-35.

- Pardue, M. L.; J. G. Gall 1970. Chromosomal localization of mouse satellite DNA. *Science*, 168: 1356-1358.
- Patterson, E. K.; S. H. Hsiao; A. Keppel 1963. Studies on dipetidases and aminopeptidases and enzymes that hydrolyze L-leucyl- $\beta$ -naphthylamide. *J. Biological Chem.*, 238: 3611-3620.
- Peacock, J. T.; C. McMillan 1965. Ecotypic differentiation in Prosopis (Mesquite). *Ecology*. 46: 35-51.
- Pelzer, Ch. F. 1965. Genetic control of erythrocytic esterase forms in Mus musculus. *Genetics*, 52: 819-828.
- Poulik, M. D. 1957. Starch gel electrophoresis in a discontinuous system of buffers. *Nature*, 180: 1477-1479.
- Prakash, S.; R. C. Lewontin; J. L. Hubby 1969. A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations. IV. Patterns of genic variation in central, marginal and isolated populations of Drosophila pseudoobscura. *Genetics*, 61: 841-858.
- Quail, P. H.; J. G. Scandalios 1971. Turnover of genetically defined catalase isozymes in maize. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, 68: 1402-1406.
- Randerson, S. H. 1965. Erythrocyte esterase forms controlled by multiple alleles in the deer mouse. *Genetics*, 52: 999-1005.
- Raymond, S.; L. Weintraub 1959. Acrylamide gel as supporting medium for zone electrophoresis. *Science*, 130: 711.
- Rick, Ch. M.; J. M. Fobes 1975. Allozymes of Galapagos tomatoes polymorphism, geographic distribution and affinities. *Evolution*, 29: 443-457.
- Rick, Ch. M.; S. D. Tanksley 1981. Genetic variation in Solanum pennellii: Comparisons with two other sympatric tomato species. *Pl. Syst. Evol.*, 139: 11-45.

- Rodríguez Rebollar, J. 1947. La plaga del vinal en Formosa. Economía Rural Boletín del Museo Social Argentino. Año XXXV. Entregas, 295-296: 30-36.
- Roose, M. L.; L. D. Gottlieb 1976. Genetic and biochemical consequences of poliploidy in Tragopogon. Evolution, 30: 818-830.
- Saidman, B. O. 1981. Estudio isoenzimático de alcohol dehidrogenasa y glutamato oxalacetato transaminasa en cuatro especies de Prosopis e híbridos naturales. XII Congr. Arg. de Genética: 1.
- Saidman, B. O. 1983. Variación alozímica en cuatro especies del género Prosopis. XIV Congr. Arg. de Genética: 56.
- Saidman, B. O. 1984. Estudio isoenzimático en especies de Prosopis (Leguminosae). XV. Congr. Arg. de Genética: 66.
- Saidman, B. O.; C. A. Naranjo 1982. Variaciones de esterases en poblaciones de Prosopis ruscifolia (Leguminosae). Mendeliana, 5: 61-70.
- Sakai, R. K.; D. A. Tung; J. G. Scandalios 1969. Developmental genetic studies of aminopeptidases in Drosophila melanogaster. Molec. Gen. Genetics, 105: 24-29.
- Scandalios, J. G. 1964. Tissue-specific isozyme variations in maize. J. Hered., 55: 281-285.
- Scandalios, J. G. 1965. Leucine aminopeptidase isozymes in maize development. J. Hered, 56: 177-180.
- Scandalios, J. G. 1969. Genetic control of multiple molecular forms of enzymes in plants: a review. Biochem. Genet., 3: 37-79.
- Scandalios, J. G. 1974. Isozymes in development and differentiation. Ann. Rev. Plant Physiol., 25: 228-258.
- Scandalios, J. G. 1979. Control of gene expression and enzyme differentiation

- En: Scandalios, J. G. (ed.). Physiological genetics. Academic Press, New York: 64-105.
- Scandalios, J. G.; L. G. Espiritu. 1969. Mutant aminopeptidase of Pisum sativum. I. Developmental genetics and chemical characteristics. Molec. Gen. Genetics, 105: 101-102.
- Scandalios, J. G.; E. H. Liu; M. A. Campeau 1972. The effects of intragenic and intergenic complementation on catalase structure and function in maize: A molecular approach to heterosis. Arch. Biochem and Biophysics, 153: 695-705.
- Scandalios, J. G.; A. Baum. 1982. Regulatory gene variation in higher plants. Adv. Genetics, 21: 347-370.
- Schwartz, D. 1960. Genetic studies on mutant enzymes in maize: Synthesis of hybrid enzymes by heterozigotes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 46: 1210-1215.
- Schwartz, D. 1962a. Genetic studies on mutant enzymes in maize. I: On the mode of synthesis of the hybrid enzyme. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 48: 750-756.
- Schwartz, D. 1962b. Genetic studies on mutant enzyme in maize. III. Control of gene action in the synthesis of pH: 7.5 esterases. Genetics, 47: 1609-1615.
- Schwartz, D. 1964a. Regulation of gene action on maize. Genetics, 2: 131-135.
- Schwartz, D. 1964b. A second hybrid enzyme in maize. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 51: 602-605.
- Schwartz, D. 1964c. Genetic studies on mutant enzymes in maize. IV. Comparison of pH: 7.5 esterases synthesized in seedling and

- endosperm. *Genetics*, 49: 373-377.
- Schwartz, D. 1964d. Genetic studies on mutant enzymes in maize. V. In vitro interconversion of allelic isozymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 52: 222-226.
- Schwartz, D. 1965. Genetic studies on mutant enzymes in maize. VI. Elimination of allelic isozyme variation by glyceraldehyde treatment. *Genetics*, 52: 1295-1302.
- Schwartz, D. 1967. E<sub>1</sub> esterase isozyme in maize: On the nature of the gene controlled variation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 58: 568-575.
- Schwartz, D. 1975. The molecular basis for allelic complementation of alcohol dehydrogenase mutants of maize. *Genetics*, 79: 207-212.
- Schwartz, D.; L. Fuchsman; K. McGrath. 1965. Allelic isozymes of the pH: 7.5 esterase in maize. *Genetics*, 52: 1265-1268.
- Selander, R. K. 1980. Variación genética en las poblaciones naturales. En: Ayala, J. F. (ed.). *Evolución molecular*. Ediciones Omega, Barcelona: 21-46.
- Selander, R. K.; M. H. Smith; S. Yang; W. E. Johnson; J. B. Gentry 1971. IV. Biochemical polymorphism and systematics in the genus Peromyscus. I. Variation in the old-field mouse (Peromyscus polionotus) *Studies in Genetics VI*: 49-90.
- Selander, R. K.; W. E. Johnson 1973. Genetic variation among vertebrate species. *Ann. Rev. Ecol. Syst.*, 4: 75-91.
- Schaal, B. A.; W. W. Anderson 1974. An outline of techniques for starch gel electrophoresis of enzymes from the american oyster. Crassostrea virginica Gmelin. Tech. Report Ser. Georgia Marine Sci.
- Shaw, C. R. 1965. Electrophoretic variation in enzymes. *Science*, 149: 936-943.

- Shaw, Ch. R.; R. Prasad. 1970. Starch gel electrophoresis of enzymes. A compilation of recipes. *Biochem. Genet.*, 4: 297-320.
- Sheen, S. J.; G. R. Rebagay 1970. On the localization and tissue difference of peroxidases in Nicotiana tabacum and its progenitor species. *Bot. Gaz.*, 131: 297-304.
- Shoji, H.; D. P. Agarwal; H. W. Goedde 1978. Human liver alcohol dehydrogenase isozymes variations. Improved separation methods using prolonged high voltage starch-gel electrophoresis and isoelectric focusing. *Hum. Genet.*, 40: 215-220.
- Simon, L. M.; Z. Fatrai; D. E. Jonas; B. Matkovics 1974. Study of peroxidase metabolism enzymes during the development of Phaseolus vulgaris. *Biochem. Physiol. Pflanzen (BPP)*, 166: 387-392.
- Simpson, B. B. 1977. Breeding systems of dominant perennial plants of two disjunct warm desert ecosystems. *Oecologia (Berl.)*, 27: 203-226.
- Simpson, B. B.; O. T. Solbrig 1977. Introduction. Chap 1. En: Simpson, B. B. ( ed. ). *Mesquite. Its biology in two desert ecosystems. US/IBP synthesis. Ser. 4. Dowden, Hutchinson and Ross Inc. Pennsylvania: 1-15.*
- Singh, R. S.; R. C. Lewontin; A. A. Felton 1976. Genetic heterogeneity within electrophoretic "alleles" of xanthine dehydrogenase in Drosophila pseudoobscura. *Genetics*, 84: 609-629.
- Smith, H. H.; D. E. Hamill; E. A. Weaver; K. H. Thompson 1970. Multiple molecular forms of peroxidases and esterases among Nicotiana species and amphiploids. *J. Hered.*, 61: 203-212.
- Smith-Cavalli, S. 1976. Divergencia isozimica e relações evolutivas entre especies do genero Relbunium (Rubiaceae). Dissertação apresentada

- ao curso de pos-graduacao em genetica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul para obtencao do grau de Mestre em Genetica.
- Smithies, O. 1955. Zone electrophoresis in starch gels: Group variation in the serum proteins of normal human adults. *Biochem. J.*, 61: 629-640
- Smithies, O; M. D. Poulik 1956. Two dimensional electrophoresis of proteins. *Nature*, 177: 1033.
- Solbrig, O. T.; P. D. Cantino 1975. Reproductive adaptations in Prosopis (Leguminosae, Mimosoideae). *Journal of the Arnold Arboretum*, 56: 185-210.
- Solbrig, O. T.; K. S. Bawa 1975. Isozyme variation in species of Prosopis (Leguminosae). *Journal of the Arnold Arboretum*, 56: 398-412.
- Soulé, M. 1980. Variación aloenzimática: Sus determinantes en el espacio y en el tiempo. En: Ayala, J. A. (ed.). *Evolución Molecular. Ediciones Omega*: 61-79.
- Souto, J.; B. A. Eilberg 1972. Efectos de extractos de hojas de vinal (Prosopis ruscifolia Griseb) sobre la germinación y el crecimiento de plántulas de varias especies cultivadas. *Rev. de Inv. Agrop. INTA Bs.As.. Ser. 2. Biología y Producción Vegetal*, 9: 19-27.
- Stafford, H. A. 1974. The metabolism of aromatic compounds. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 25: 459-486.
- Stebbins, G. L. 1958. The inviability weakness and sterility of interspecific hybrids. *Adv. Genet.*, 9: 147-215.
- Suzuki, D. T.; A. J. F. Griffiths; R. C. Lewontin 1981. *An introduction to genetic analysis* (2°ed.). W. H. Freeman and Co.. San Francisco.
- Tabachnick, W. J.; D. J. Howard 1982. Genetic control of hexokinase variation in insects. *Biochem. Genet.*, 20: 47-58.

- Tang, K. S.; G. E. Hart 1975. Use of isozymes as chromosome markers in wheat-rye addition lines and in triticale. *Genet. Res. Camb.*, 26: 187-201.
- Templeton, A. R. 1979. The theory of speciation via the founder principle. *Genetics*, 94: 1011-1038.
- Tigerstedt, P. M. A. 1974. Genetic structure of Picea abies populations as determined by the isozyme approach. Proceeding Joint IUFRO Meeting, S.02.04. Stockholm, Session V: 1-3,
- Tiselius, A. 1937. A new apparatus for electrophoretic analysis of colloidal mixtures. *Trans. Farady Soc.*, 33: 524-531.
- Torres, M. A.; G. E. Hart 1976. Developmental specificity and evolution of the acid phosphatase isozymes of Triticum aestivum and its progenitor species. *Biochem. Genet.*, 14: 595-609.
- Torres de Lemos, C. 1983. Relações fenéticas entre as espécies do complexo Briza (Gramineae): Isoesterasas. Dissertação apresentada ao Curso de pós-graduação em genética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, para obtenção do grau de Mestre em Genética.
- Turner, B. J. 1974. Genetic divergence of death valley pupfish species: Biochemical versus morphological evidence. *Evolution*, 28: 281-294.
- Vello Jaaska, T. 1981. Aspartate aminotransferase and alcohol dehydrogenase isoenzymes intraspecific differentiation in Aegilops tauschii and the origin of the D genome polyploids in the wheat group. *Pl. Syst. Evol.*, 137: 259-273.
- Wallace, B. 1958. The role of heterozygosity in Drosophila populations. *Proc. Int. Congr. Genet.* 10<sup>th</sup>, 1: 408-419.
- Weinberg, W. 1908. Über den nachweis der vererbung beim menschen, jahreshefte

- verein, Naturkunde Wurttemberg, 64: 368-382.
- Weisiger, R. A.; I. Fridovich 1973. Superoxide dismutase organelle specificity. *J. Biol. Chem.*, 248: 3582-3592.
- Williamson, J. A.; R. A. Kleese; J. R. Snyder 1968. Electrophoretic variation in esterases of three varieties of oats (Avena sativa) *Nature*, 220: 1134-1136.
- Whitmore, D. H.; L. H. Bragg 1979. Isozymal differentiation between two species of Prosopis. *Biochem. Syst. Ecol.*, 7: 299-302.
- Wright, D. A.; Ch. Shaw 1970. Time of expression of genes controlling specific enzymes in Drosophila embryos. *Biochem. Genet.*, 4: 385-394.
- Yanofsky, C.; G. R. Drapeau; J. R. Guest; B. C. Carlton. 1967. The complete amino-acid sequence of the tryptophan synthetase  $\alpha$  - subunit) and its colinear relationship with the genetic map of the gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 57: 296-298.
- Young, J. P. W.; R. K. Koehn; N. Arnheim 1979. Biochemical characterization of "LAP" a polymorphic aminopeptidase from the blue mussel, Mytilus edulis. *Biochem. Genet.*, 17: 305-323.
- Zera, A. J. 1981. Extensive variation at the  $\alpha$ -glycerophosphate dehydrogenase locus in species of waterstriders (Gerridae, Hemiptera). *Biochem. Genet.*, 19: 797-812.
- Zouros, E. 1975. Electrophoretic variation in allozymes related to function or structure? *Nature*, 254: 446-448.
- Zouros, E.; S. Tsakas; C. B. Krimbas. 1968. The genetics of Dacus oleae. II. The Genetics of two adult esterases. *Genet. Res. Camb.*, 12: 1-9.
- Zouros, E.; W. VanDelden; R. Odense; H. Van Dijk 1982. An esterase duplication in Drosophila: Differences in expression of duplicate loci within and among related species. *Biochem. Genet.*, 20: 929-942.