



ESTUDIOS EVOLUTIVOS Y POBLACIONALES EN EL GÉNERO *PROSOPIS* UTILIZANDO MARCADORES BIOQUÍMICOS Y MOLECULARES

*EVOLUTIVE AND POBLATIONAL STUDIES IN THE GENUS PROSOPIS
USING BIOCHEMICAL AND MOLECULAR MARKERS*

BEATRIZ O. SAIDMAN^{1*}, CECILIA F. BESSEGA^{1#}, LAURA FERREYRA¹,
NORMA JULIO² Y JUAN C. VILARDI^{1*}

¹ Departamento de Ecología, Genética y Evolución, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. 1428. Buenos Aires.

² Cátedra de Genética de Poblaciones y Evolución. Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Universidad Nacional de Córdoba.

* Miembro de la Carrera del Investigador Científico. Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET).

#Becaria del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET).

Parte de los resultados presentados en el presente trabajo integran las tesis doctorales de C. F. Bessega, L. I. Ferreyra y N. Julio y su participación en este trabajo fue equivalente.

RESUMEN

La forma en que se distribuye la variabilidad genética dentro y entre poblaciones depende de diferentes factores entre los que se puede mencionar el sistema reproductivo y la estrategia adaptativa. La estructura de las poblaciones, a su vez, establece restricciones a los procesos evolutivos tendientes a la adaptación creciente al ambiente y/o la diferenciación específica.

Los marcadores bioquímicos y moleculares constituyen herramientas para evaluar la proporción de la diversidad genética en entidades de complejidad creciente. Esta información permite hacer inferencias acerca de los mecanismos evolutivos que podrían haber conducido al escenario actual.

En el género *Prosopis* se realizaron estudios de estructura poblacional y se analizó la diferenciación genética en 15 especies de la Sección Algarobia, *Strombocarpa* y *Monilicarpa* utilizando las técnicas de isoenzimas, RAPD, RFLP y Secuenciación de ADN.

En siete especies de la sección Algarobia se analizó, a partir de datos provenientes de electroforesis de isoenzimas, el sistema de apareamiento, pudiendo demostrarse que

aunque éstas son mayormente exógamas, pueden presentar hasta un 28% de autofecundación, con un promedio del 19%.

La variabilidad genética en especies de *Algarobia* es alta, pero tiende a ocurrir dentro de las poblaciones. Por esta razón con muestras de pocas poblaciones se cubre la mayor parte de la variación genética detectada por isoenzimas y por la técnica de RAPD.

Con excepción de *P. kuntzei*, las especies de *Algarobia* son muy afines entre sí independientemente de su nivel de ploidía y distribución geográfica y las mismas no se agrupan de acuerdo con las series.

En las especies estudiadas de la sección *Strombocarpa* la variabilidad es mucho menor que en *Algarobia*. Estas especies se diferencian mucho entre sí y se separan claramente de las de *Algarobia*.

Finalmente *P. argentina* (secc. *Monilicarpa*) es la especie más diferenciada de las estudiadas hasta el presente.

La hibridación natural es un hecho frecuente entre especies de la sección *Algarobia*. La técnica de RAPD ha permitido obtener bandas marcadoras de especie que podrían utilizarse para inferir los progenitores putativos de híbridos naturales.

Finalmente los resultados obtenidos por las técnicas de RFLP de mitocondrias y cloroplastos, así como la de secuenciación de un fragmento de este último plástido han permitido estudios cladísticos que confirman la alta afinidad entre especies de *Algarobia* y brindan evidencias de que las mismas tendrían un origen común.

Palabras clave: Isoenzimas, RAPD, Secuenciación de ADN, Estructura Poblacional.

SUMMARY

The way in which genetic variability is distributed within and among populations depends on different factors, outstanding among these are the reproductive system and the adaptive strategy. Population structure, in turn, imposes restrictions to those evolutionary processes tending to a growing adaptation to the environment and/or specific differentiation.

*Studies on population structure were made for the *Prosopis* genus and the genetic differentiation was analyzed for 15 species of *Algarobia*, *Strombocarpa* and *Monilicarpa* Sections using isoenzyme techniques, RAPD, RFLP and DNA sequencing. The linkage system was analyzed in 7 species of the *Algarobia* Section from data obtained from isoenzyme electrophoresis, which showed that although these species are mostly exogamous they can reach up to 28% of self-fecundation, with an*

average of 19%. This behaviour and the limited capacity for pollen and seed dispersal determine an excess of homozygotes in the populations.

Except for *P. kuntzei*, *Algarobia* species are closely related, independently of their ploidy level and geographical distribution, and are not grouped according to series.

Species in the *Strombocarpa* Section exhibit much lower variability than those in *Algarobia*.

P. argentina (*Monilicarpa* Section) is the most distinctly differentiated of the species studied to date. Natural hybridation is frequent among species of the *Algarobia* Section. This phenomenon and the great similarity among these species make their recognition difficult.

The results obtained using RFLP techniques in mitochondria and chloroplasts confirm the great affinity among *Algarobia* species, and provide evidence that they would have a common origin.

Key words: Isoenzymes, RADP, DNA sequencing, population structure.

INTRODUCCIÓN

El género *Prosopis* ha despertado gran interés en los últimos años dado que constituye un recurso promisorio para reforestación y recuperación de suelos empobrecidos en regiones áridas y semiáridas. Desde el punto de vista ecológico estas especies cumplen importantes funciones, que incluyen fijación de nitrógeno, control de la erosión del suelo y estabilización de médanos y presentan tolerancia a la sequía y a suelos salinos. Desde el punto de vista económico sus usos son muy diversos: alimentos y forraje, combustible, leña, elaboración de alcohol, fabricación de muebles y producción de taninos y exhiben una excelente adaptación a sistemas agroforestales y silvopastoriles.

La provincia biogeográfica chaqueña en la Argentina constituye un importante centro de polimorfismo de este grupo (Burkart, 1976). De las 44 especies que comprende el género, unas 28 pueden encontrarse en este país, ocupando diferentes provincias biogeográficas pertenecientes al dominio Chaqueño (para una revisión de las regiones biogeográficas en Sudamérica ver Cabrera y Willink, 1980). La explotación racional de especies nativas requiere de un amplio conocimiento de la taxonomía, biología, ecología y genética. A partir de los estudios pioneros sobre taxonomía (ver Burkart, 1976), se realizaron estudios sobre las relaciones entre especies del grupo basados en diversas técnicas, tales como cromatografía, citogenética, electroforesis de proteínas seminales e isoenzimas, que fueron revisados por Hunziker *et al.* (1986). Durante los últimos años los avances de la biología molecular permitieron incorporar nuevos marcadores útiles en estudios poblacionales y filogenéticos para resolver problemas relacionados con la estructura genética, sistema de fecundación, identifica-

ción de híbridos naturales y relaciones entre las diferentes especies del género (Saidman, 1985, 1993; Saidman y Vilardi, 1987, 1993, Bessega *et al.*, 2000a, 2000b, 2000c).

MATERIAL Y MÉTODO

Estudios alozímicos

La mayor parte de los estudios acerca de la variación genética en especies de *Prosopis* se basan en electroforesis de isoenzimas. Hasta el presente se estudiaron isoenzimáticamente 19 especies, 13 pertenecientes a la sección Algarobia, 5 de *Strombocarpa* y *P. argentina* de la sección *Monilicarpa* (Tabla 1). Dentro de la sección Algarobia se analizaron además poblaciones que comprendían híbridos naturales interespecíficos. Esta técnica permitió estimar parámetros para cuantificar (a) la variabilidad genética dentro de las poblaciones, (b) la estructura genética, (c) el sistema de fecundación y (d) la diferenciación genética entre poblaciones y especies.

La variabilidad fue cuantificada por medio de diferentes índices incluyendo la proporción de loci polimórficos (P), la heterocigocidad media (H), el número efectivo de alelos (ne), el número total de alelos (A). Los resultados obtenidos hasta el presente muestran diferencias importantes entre las especies de las secciones Algarobia y *Strombocarpa* en el grado de variabilidad dentro de las poblaciones. En la primera la variabilidad fue mucho mayor ($H=0.21\pm0.01$, $P=51.5\pm1.9$, $ne=1.30$, $A=1.81$) que en las especies de *Strombocarpa* ($H=0.07\pm0.01$, $P=15.3\pm2.3$, $ne=1.06$, $A=1.15$).

La frecuente ocurrencia de híbridos naturales interespecíficos e introgresantes entre especies de Algarobia se consideró inicialmente como una posible explicación de la mayor variabilidad genética en esta sección. Por este motivo se realizaron estudios de estructura poblacional y se estimaron los coeficientes F_{ST} jerárquicos y no jerárquicos y el índice de fijación F_{IS} (Wright, 1951, 1978). La hipótesis a evaluar era que si las barreras reproductivas entre las especies eran débiles, las especies simpátricas podrían mantener un alto flujo génico, reduciendo la diferenciación entre ellas y aumentando su variabilidad. Los resultados de estos análisis indicaron que la diferenciación entre poblaciones coespecíficas, cuantificada por medio del coeficiente F_{ST} , era menor que entre poblaciones de distintas especies que cohabitaban en una misma localidad. La interpretación de estos resultados es que a pesar de la capacidad de hibridar en simpatria, el flujo génico efectivo entre distintas especies no sería significativo (Saidman *et al.*, 1998a; Ferreyra, 2001). Algunos loci, como *Adh-1*, *Adh-2*, *Idh-1* e *Idh-2* serían los que más contribuyen a la diferenciación entre las especies.

El índice F_{IS} indicó que en la mayoría de las especies estudiadas de Algarobia había un significativo exceso de homocigotas con respecto a lo esperado para poblaciones panmícticas ($F_{IS} > 0$) (Montoya *et al.*, 1994; Julio, 2000; Ferreyra, 2001; Bessega,

Tabla 1. Especies y poblaciones de *Prosopis* analizadas hasta el presente mediante isoenzimas, RAPD, RFLP o secuenciación

Table 1. Species and populations of *Prosopis* analyzed up to the present time by means of inoenzymes, RAPD, RFLP or secuenciación

SECCIÓN	SERIE	ESPECIE	POBLACIÓN	COLECTOR		
Algarobia	Ruscifoliae	<i>P. ruscifolia</i>	Herrera, Sgo. del Estero	BOS-JCV		
			Sarmiento, Sgo. Del Estero	BOS-JCV		
			Rivadavia, Salta	BOS-JCV		
			Pinto, Sgo. del Estero	BOS-JCV		
			7 de abril, Tucumán	BOS-JCV		
				<i>P. vinalillo</i>	Dept. Patiño, Formosa	RAP
				<i>P. hassleri</i>		
		Chilenses		<i>P. nigra</i>	La Banda, Sgo. del Estero	BOS-JCV
					Paraná, Entre Ríos	CAN
					La Merced, Salta	BOS-JCV
					Huilla Catina, Sgo. del Estero	BOS-JCV
				<i>P. caldenia</i>	Santa Rosa, La Pampa	BOS-JCV-CAN
					R152 Km. 95, La Pampa	BOS-JCV-PS-HT
				<i>P. flexuosa</i>	Quilmes, Tucumán	BOS-JCV
					La Amarga, La Pampa	BOS-JCV
					Pipanaco, Catamarca	MC
				<i>P. alpataco</i>	Chacharramendi, La Pampa	BOS-JCV
					R152 Km. 95, La Pampa	BOS-JCV-PS-HT
				<i>P. alba</i>	Trancas, Tucumán	BOS-JCV
					Chicoana, Localidad	BOS-JCV
					La Merced, Salta	BOS-JCV
					Sumalao, Salta	BOS-JCV
					Burruyacu, Tucuman	BOS-JCV
					Curtiembres, Salta	BOS-JCV
					Icaño, Sgo. del Estero	BOS-JCV
					Casares, Sgo. del Estero	BOS-JCV
				<i>P. glandulosa</i>	Weslaco, Texas	JE
					La Copita, Texas	JE
					Bell Co, Texas	JE
					Frio Co, Texas	JE
				<i>P. velutina</i>	Santa Rita, Arizona	JE
				<i>P. chilensis</i>	Villa Dolores, Córdoba	NJ
					Patquía, La Rioja	NJ
					Belén, Catamarca	NJ
					Las Talas, La Rioja	NJ
					Talampaya, La Rioja	NJ
					La Higuera; San Luis	NJ
			Media Naranja, Córdoba	NJ		
			Chacabuco, Santiago (Chile)	NJ		
			Monte Patria, Limari (Chile)	NJ		
			Soto, Córdoba	NJ		
			Conlara, Córdoba	NJ		
			Astica, San Juan	NJ		
		<i>P. juliflora</i>	Cartagena, Colombia	JH		
			Altamira, Colombia	JH		

SECCIÓN	SERIE	ESPECIE	POBLACIÓN	COLECTOR
		<i>P. alba x</i> <i>P. nigra</i> <i>P. alba x</i> <i>P. flexuosa</i>	Pampa Blanca, Jujuy El Alamo, Salta	BOS-JCV BOS-JCV
	Pallidae	<i>P. affinis</i>	Hasenkamp, Entre Ríos	FM
	Sericanthae	<i>P. kuntzei</i>	Tacana, Tucumán Herrera, Sgo. del Estero	BOS-JCV BOS-JCV
Strombocarpa	Strombocarpae	<i>P. strombulifera</i> <i>P. reptans</i> <i>P. torquata</i> <i>P. pubescens</i>	Copacabana, Catamarca Conesa, Río Negro Herrera, Sgo. del Estero Icaño, Sgo del Estero Famatina, La Rioja Bell Co, Texas	BOS-JCV AB BOS-JCV BOS-JCV JCV-JH JE
Monilicarpa	Cavenicarpae	<i>P. ferox</i> <i>P. argentina</i>	Los Cardones, Salta Tucunuco, San Juan Tinogasta, Catamarca	MP PV PV

BOS: B.O. Saidman, JCV: J.C. Vilardi, RAP: R.A. Palacios, CAN: C.A. Naranjo, PS: P. Steibel, HT: H. Triani, MC: M. Cony, JE: J. Evans, NJ: N. Julio, JH: J. Hunziker, FM: F. Mollard, AB: A. Burghardt, MP: M. Pocoví, PV: P. Villagra.

1997; 2001; Bessega *et al.*, 2000c). Este resultado era contradictorio con ciertas evidencias que sugerían que estas especies serían de fecundación cruzada obligada (Burkart, 1976; Simpson, 1977; Simpson *et al.*, 1977). Por este motivo se realizó un estudio de los parámetros del sistema de fecundación en poblaciones naturales de siete especies por medio de los coeficientes de exocruza t (Ritland y Jain, 1981). El método de análisis fue el de Brown y Allard (1970) utilizando el programa MLTR (versión mejorada del programa MLT; MLTR, Ritland) Éste se basó en la segregación de variantes alozímicas, agrupando las muestras poblacionales en familias constituidas por semillas provenientes de una misma planta madre (medio hermanas) (Bessega *et al.*, 2000c). Los coeficientes de exocruza a nivel multilocus (t_m) y de loci individuales (t_s) indicaron que la proporción de autofecundación variaba de 0.72 a 1.0, lo que implica que, aunque las especies son principalmente exógamas, puede ocurrir hasta un 28% de autofecundación, con un promedio del 15%. Esta tasa de autofecundación podría explicar valores de F_{IS} promedio de aproximadamente 0.08, mientras que los valores estimados de F_{IS} en las mismas poblaciones oscilaron entre 0.07 y 0.48, con un promedio de 0.27 (Bessega *et al.*, 2000b). La diferencia entre el valor de F_{IS} esperado en función de la tasa estimada de exocruza y los valores observados se interpretó como el producto de subestructuración de las poblaciones (Bessega *et al.*, 2000c). Dicha subestructuración podría deberse a que la dispersión del polen en especies de *Algarobia*

sería limitada (Genisse *et al.*, 1990; Bessega *et al.*, 2000c), lo que favorecería el cruzamiento entre árboles vecinos.

Al estimar los coeficientes F_{IS} en las plantas madres, Bessega *et al.* (2000c) observaron que éstos eran menores que en las semillas y propusieron que esto podría deberse a selección en favor de los heterocigotas.

Una información importante para planes de conservación de germoplasma y explotación racional de especies promisorias se relaciona con la distribución de la variación genética entre y dentro de regiones y poblaciones. Esta información permite tomar decisiones acerca de la mejor estrategia de muestreo para bancos de germoplasma y de selección de caracteres benéficos heredables. *P. chilensis* es una de las especies más promisorias para programas de reforestación (Burkart, 1976). Su alta variabilidad morfológica aparentemente asociada a la diversidad climática y edáfica, así como su alta productividad de frutos (Roig, 1993; Cony, 1993; Karlin y Diaz, 1998a,b) alientan el desarrollo de programas de selección. En esta especie se realizó un análisis jerárquico de la distribución de la variabilidad a partir de un muestreo que involucraba 12 poblaciones pertenecientes a 3 regiones geográficas: Provincia Biogeográfica Chaqueña (Córdoba y San Luis), Provincia Biogeográfica del Monte (La Rioja, Catamarca y San Juan) y Valle Central de Chile (Julio, 2000). Los resultados indicaron que la mayoría de la variación (~87% de la diversidad total) ocurre dentro de las poblaciones. La diferenciación entre las poblaciones dentro de cada región fue baja (~13%), mientras que no hay divergencia entre regiones.

El mismo método estadístico permitió evaluar cómo se distribuye la variación genética entre y dentro de especies de la sección Algarobia. Para ello se consideraron dos niveles jerárquicos: especie y población. Bessega *et al.* (2000b) estudiando dos especies argentinas (*P. flexuosa* y *P. ruscifolia*) y una especie norteamericana (*P. glandulosa*) y Ferreyra (2001) estudiando seis especies argentinas obtuvieron conclusiones similares. Más del 60% de la diversidad total ocurre dentro de las poblaciones, la menor diversidad (13%) se verifica entre poblaciones de la misma especie y la diferenciación entre especies es intermedia (16-24%) entre las anteriores. Curiosamente, la inclusión de especies muy aisladas geográficamente en el estudio realizado por Bessega *et al.* (2000b) no se ve acompañado de un incremento de la diferenciación genética entre especies. En otros estudios (Saidman *et al.*, 1997) se observó también que poblaciones tetraploides de *P. juliflora* de Colombia mostraban alta similitud genética con especies diploides argentinas (*P. caldenia* y *P. ruscifolia*). Estos resultados son una fuerte evidencia en contra de la hibridación como explicación de la alta similitud genética observada entre especies de Algarobia. Por lo tanto, aunque no puede descartarse que la hibridación haya jugado un papel en las primeras etapas de la diversificación específica de este grupo, es muy probable que la alta variabilidad compartida y la escasa diferenciación entre estas especies se deba a que el efecto fundador haya tenido poca importancia durante la especiación, como consecuencia de

tasas de crecimiento poblacional altas. En contraste, la evolución de rasgos morfológicos podría haber sido rápida como respuesta a la adaptación a distintos nichos ecológicos, promoviendo claras diferencias entre las especies.

A diferencia de lo observado en Algarobia, las especies estudiadas de *Strombocarpa* están muy diferenciadas genéticamente entre sí. Sólo dos especies de esta sección, *P. reptans* y *P. strombulifera*, son muy afines entre sí, y, por una serie de criterios independientes, se sugiere que podrían constituir variedades o subespecies más que especies (Hunziker *et al.*, 1986; Saidman *et al.*, 1996). Las especies estudiadas de *Strombocarpa* y la única especie de *Monilicarpa*, *P. argentina*, se diferencian claramente de las de Algarobia.

En conclusión, los estudios alozímicos han contribuido a la interpretación de las relaciones entre las especies de este género y a la caracterización de la estructura poblacional. Sin embargo, estos marcadores no aportan loci que puedan utilizarse para identificar taxonómicamente las especies de la sección Algarobia analizadas hasta el momento.

Estudios basados en marcadores moleculares

Dado que muchas de las especies económicamente más importantes pertenecientes a la sección Algarobia hibridan naturalmente, sería fundamental contar con una herramienta que permitiera identificar los posibles progenitores de dichos híbridos. Estos marcadores serían útiles también para evaluar los resultados de cruzamientos interespecíficos controlados con el objeto de combinar propiedades de interés agroforestal de distintas especies.

Una técnica relativamente sencilla que permite analizar simultáneamente muchos loci se basa en el análisis de polimorfismos de fragmentos de ADN amplificados al azar (RAPD). Utilizando este método se analizaron poblaciones naturales de *P. flexuosa*, *P. alba*, *P. nigra*, *P. ruscifolia* y *P. vinalillo* e híbridos naturales determinados morfológicamente como *P. alba* x *P. flexuosa* y *P. alba* x *P. nigra* (Tabla 1 y Saidman *et al.*, 1998a).

El análisis de los patrones de bandas obtenidos mediante esta técnica permitió por primera vez obtener marcadores moleculares que diferencian *P. alba*, *P. ruscifolia* y *P. nigra*. (Ferreyra *et al.*, inédito) Asimismo, en las poblaciones híbridas (Saidman *et al.*, 1998a) se pudo reconocer los posibles progenitores. Una de ellas (*P. alba* x *P. flexuosa*) mostró patrones correspondientes a lo esperado por introgresión hacia uno de los progenitores (*P. flexuosa*). Sin embargo la otra población (*P. alba* x *P. nigra*) mostró patrones complejos donde estaban presentes bandas adicionales, no presentes en ninguno de sus progenitores putativos.

Los resultados obtenidos son también importantes para interpretar el posible origen de *P. vinalillo*. Según Burkart (1976) esta especie se habría originado como un híbrido

entre *P. alba* y *P. ruscifolia*. Los marcadores RAPD obtenidos hasta el momento indican que esta especie tiene bandas de *P. ruscifolia* y de *P. nigra*, pero en ningún caso se observaron bandas de *P. alba* (Ferreya *et al.*, inédito), de modo que los resultados presentes no apoyarían la hipótesis de Burkart.

Los resultados obtenidos hasta el momento son promisorios y permiten suponer que el análisis de un mayor número de cebadores (“primers”) permitirá la caracterización inequívoca de éstas y otras especies de la sección Algarobia.

Los RAPD fueron utilizados también para estudios de estructura poblacional y diferenciación genética entre poblaciones. Los resultados obtenidos por RAPD en tres especies argentinas (*P. flexuosa*, *P. nigra* y *P. alba*) y dos norteamericanas (*P. glandulosa* y *P. velutina*) se compararon con los obtenidos por estudios alozímicos (Bessega *et al.*, 2000a). Los RAPD y las isoenzimas fueron coincidentes en mostrar alta variabilidad genética. Cuando se consideraron todas las poblaciones ambos marcadores produjeron estimas altas de la diferenciación genética medida a través del coeficiente F_{ST} , lo cual sugeriría que el flujo génico sería escaso. Al analizar solamente poblaciones de *P. glandulosa*, los datos de isoenzimas, de acuerdo con lo esperado para poblaciones coespecíficas, mostraron una reducción de la estima del F_{ST} compatible con un flujo génico mayor. Sin embargo, este efecto no se evidenció para los marcadores RAPD.

Estos marcadores, mostraron valores más altos de diferenciación genética entre las poblaciones coespecíficas de *P. glandulosa* que los obtenidos a partir de las isoenzimas y podrían resultar más útiles para realizar estimas de la variabilidad dentro de estas especies. Por otra parte, las isoenzimas fueron más útiles para diferenciar *P. glandulosa* de *P. velutina*, en base a los sistemas GOT y PRX.

Un método objetivo que permite estimar las afinidades entre especies y que no se ve afectado por el ambiente o problemas de desarrollo se basa en la comparación de fragmentos de ADN obtenidos por digestión con endonucleasas de restricción (RFLP) y/o por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y secuenciación de segmentos de ADN específicos. Mediante este tipo de técnicas es posible además comparar genes nucleares y citoplasmáticos, que poseen diferentes sistemas de transmisión, lo que permite realizar inferencias con respecto a los mecanismos evolutivos involucrados.

Se aplicaron las técnicas de RFLP de ADN mitocondrial y ribosómico y PCR de un espaciador no transcrito de ADNr en las especies *P. ruscifolia*, *P. flexuosa*, *P. chilensis*, *P. kuntzei* (Secc. Algarobia), *P. ferox*, *P. reptans* y *P. pubescens* (Secc. Strombocarpa) y en híbridos *P. chilensis* x *P. flexuosa*. Para cada tipo de genoma se realizaron análisis independientes de agrupamiento a partir de las similitudes entre especies. Los resultados de ambos son coherentes con la clasificación morfológica, salvo por el hecho de que *P. pubescens* aparece aislada y no se agrupa con otras especies de su misma serie. Los datos de ADNr, en concordancia con los estudios alozímicos, agrupan cercanamente las especies de Algarobia, mientras que las de Strombocarpa

están mucho más dispersas. Los resultados del ADNmt, a diferencia de los isoenzimáticos, son consistentes con la morfología por cuanto separa las especies de distintas series (Saidman *et al.*, 1998b).

Mediante la técnica de RFLP se realizó un análisis cladístico basado en el ADN del cloroplasto (ADNcp) en una especie de Strombocarpa (*P. reptans*) y 10 especies de Algarobia (Serie Ruscifoliae: *P. ruscifolia* y *P. vinalillo*; Ser. Chilenses: *P. alba*, *P. glandulosa*, *P. caldenia*, *P. flexuosa*, *P. alpataco* y *P. nigra*; Ser. Pallidae: *P. affinis*; Ser. Sericanthae: *P. kuntzei*). *Acacia aroma* se utilizó como grupo externo. Se analizaron los fragmentos obtenidos por digestión con 10 enzimas de restricción utilizando como sondas dos regiones de ADNcp de *Nicotiana tabacum*. La primera región estudiada corresponde a 17.4 kb. de la región SSC del cloroplasto mientras que la otra región corresponde a 10.3 kb. del IR.

No se observó variación intraespecífica ni diferenciación entre los patrones de restricción de las especies de la Sección Algarobia, excepto *P. kuntzei* que presentó patrones característicos diferenciales con respecto a las otras especies (Bessega, 2001; Bessega *et al.*, inédito).

Se analizó además la secuencia nucleotídica de un fragmento 1500 pb de ADNcp. El fragmento se obtuvo por la amplificación por PCR, utilizando cebadores universales de la región espaciadora intergénica *trnT-trnD*. Los resultados permitieron construir un único árbol de máxima parsimonia que mostró que *P. reptans* y *P. kuntzei* se separan tempranamente entre sí y del resto de las especies estudiadas. Las especies de la sección Algarobia no mostraron, a diferencia de los estudios de ADNmt una topología en el cladograma acorde con lo esperado a partir de las series propuestas en base a la morfología (Bessega, 2001; Bessega *et al.*, inédito).

Visto en su conjunto, las evidencias bioquímicas y moleculares coinciden en mostrar una gran afinidad entre las especies de Algarobia, con la excepción de *P. kuntzei*. Las distancias genéticas entre las especies analizadas de las series Ruscifoliae, Chilenses y Pallidae, en algunos casos son tan bajas como las registradas en otros géneros para poblaciones pertenecientes a subespecies o razas geográficas de la misma especie. Estos resultados sugieren que las mismas podrían estar en una etapa temprana de especiación. *P. reptans* (Strombocarpa) y *P. kuntzei* (serie Sericanthae) se habrían separado tempranamente del resto de las especies analizadas hasta el presente (Saidman y Vilardi, 1987; Pocoví, 1992; Bessega, 2001; Bessega *et al.*, inédito).

AGRADECIMIENTOS

El material argentino analizado fue determinado gentilmente por RA. Palacios (UBA), el material de Norteamérica fue cedido por el Dr. CJ De Loach (Grassland Research Station- USDA/ARS), las poblaciones de *P. argentina* y parte de *P. flexuosa* fueron

cedidas por P. Villagra y M. Cony (IADIZA, Argentina). Este trabajo fue realizado gracias al apoyo financiero de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (PICT 6628), Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (PIP 0722/98) y Universidad de Buenos Aires (PIP UBACYT X086).

BIBLIOGRAFÍA

- BESSEGA, C., 1997. *Estudios isoenzimáticos en especies Americanas del Género Prosopis (Leguminosae)*. Tesis de Licenciatura. FCEyN. Universidad de Buenos Aires.
- BESSEGA C., 2001. *Estructura poblacional y relaciones filogenéticas (distancia y parsimonia) en especies del género Prosopis (Leguminosae)*. Tesis de Doctorado. FCEyN. Universidad de Buenos Aires.
- BESSEGA, C., B.O. SAIDMAN & J. C. VILARDI, 2000a. Isozyme and RAPD Studies in *Prosopis glandulosa* and *P. velutina* (Leguminosae, Mimosoideae). *Genetics and Molecular Biology* 23 (3):1-5.
- BESSEGA, C., L. FERREYRA, B. O. SAIDMAN & J. C. VILARDI, 2000b. Unexpected low genetic differentiation among allopatric species of section Algarobia of *Prosopis* (Leguminosae). *Genetica* 109:255-266.
- BESSEGA, C., L. I. FERREYRA, N. JULIO, S. MONTOYA, B. O. SAIDMAN & J. C. VILARDI, 2000c. Mating system parameters in species of genus *Prosopis* (Leguminosae). *Hereditas* 132:19-27.
- BESSEGA, C., M. CLEMENTE, J. C. VILARDI & B. O. SAIDMAN. *Phylogenetic relationships among species of Genus Prosopis (Fabaceae) based on cpDNA variation*. Inédito
- BROWN, A. H. D. & R. W. ALLARD, 1970. Estimation of the mating system in open-pollinated maize populations using isozyme polymorphisms. *Genetics* 66:133-145.
- BURKART A., 1976. A monograph of the genus *Prosopis* (Leguminosae subfam. Mimosoidae). *Journal Arnold Arboretum* 57:219-525
- CABRERA, A. L. & A. WILLINK, 1980. Biogeografía de América Latina. *Monografías Científicas de la OEA*. vol. 13. Buenos Aires, Argentina.
- CONY, M., 1993. Reforestación racional de zonas áridas y semiáridas con árboles de múltiples propósitos. *Interciencia* 20:249-253.
- FERREYRA, L., 2001. *Estudio de la variabilidad y la diferenciación genética por medio de técnicas de isoenzimas y RAPD en poblaciones naturales de especies e híbridos del Género Prosopis (Leguminosae, Mimosoidae)*. Tesis de Doctorado. FCEyN. Universidad de Buenos Aires.
- FERREYRA, L. I., C. BESSEGA, B. O. SAIDMAN & J. C. VILARDI. *First report on RAPD patterns able to differentiate some species of section Algarobia (Prosopis, Leguminosae)*. Inédito.
- GENISSE, J., R. A. PALACIOS, P. S. HOC, R. CARRIZO, L. MOFFAT, M. P. MOM, M. A. AGULLO, P. PICCA & S. TORREGOSA, 1990. Observaciones sobre la biología floral de *Prosopis* (Leguminosae, Mimosoidae). II Fases florales y visitantes en el distrito Chaqueño Serrano. *Darwiniana* 30:71-85.
- HUNZIKER, J. H., C. A. NARANJO, R. A. PALACIOS, L. POGGIO & B. O. SAIDMAN, 1986. Studies on the taxonomy, genetic variation and biochemistry of Argentine species of *Prosopis*. *Forest Ecology and Management* 16 (1-4):301-315.

- JULIO, N. B., 2000. *Estudios alozímicos sobre variabilidad, estructura y diferenciación genética en Prosopis chilensis (Leguminosae, Mimosoideae) y especies relacionadas*. Tesis de Doctorado. Cs. Biológicas, Universidad Nacional de Córdoba.
- KARLIN, U. & R. DIAZ, 1988a. Otros posibles usos. En: *Prosopis en la Argentina. Documento preliminar elaborado para el Primer Taller Internacional sobre recursos genéticos y Conservación de Germoplasma de Prosopis*. Pp: 237. FAO, FCA-UNC y FCEyN-UBA.
- KARLIN, U. & R. DIAZ, 1988b. Sistemas agroforestales. En: *Prosopis en la Argentina. Documento preliminar elaborado para el Primer Taller Internacional sobre recursos genéticos y Conservación de Germoplasma de Prosopis*. Pp: 235. FAO, FCA-UNC y FCEyN-UBA.
- MONTOYA, S., B. O. SAIDMAN, J. C. VILARDI & C. BESSEGA, 1994. Diferenciación y flujo genético entre especies de la Sección Algarobia, Género *Prosopis* (Leguminosae). XXIV Congreso de la Sociedad Argentina de Genética: 17.
- POCOVÍ, M. I., 1992. *Estudios isoenzimáticos en especies de Prosopis (Leguminosae, subf. Mimosoideae)*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Naturales. Universidad Nacional de Salta.
- RITLAND, K. & S. JAIN, 1981. A model for the estimation of outcrossing rate and gene frequencies using n independent loci. *Heredity* 47:35-52.
- ROIG, F. A., 1993. Aportes a la Etnobotánica del Género *Prosopis*. En: *Contribuciones Mendocinas a la quinta Reunión Regional para América Latina y el Caribe de la Red de Forestación del CIID*. Pp: 99-121. Unidades de Botánica y Fisiología vegetal. IADIZA.
- SAIDMAN, B. O., 1985. *Estudio de la variación alozímica en el género Prosopis*. Tesis Doctoral, FCEyN. Universidad de Buenos Aires.
- SAIDMAN, B. O., 1993. Las isoenzimas en el estudio de la variación genética y las afinidades entre especies de *Prosopis*. *Bol. Genét. Inst. Fitotéc. Castelar* 16:25-37.
- SAIDMAN, B. O. & J. C. VILARDI., 1987. Analysis of the genetic similarities among seven species of *Prosopis* (Leguminosae: Mimosoideae). *Theoretical Applied Genetics* 75:109-116.
- SAIDMAN, B. O. & J. C. VILARDI, 1993. Genetic variability and germplasm conservation in the genus *Prosopis*. En: Puri, S. (ed). *Nursery Technology of Forest Tree Species of Arid and Semiarid Regions*. Pp. 187-198. Winrock-oxford & IBH Publishing Co. PVT. LTD., New Delhi, Bombay, Calcuta.
- SAIDMAN, B. O., J. C. VILARDI, M. I. POCOVÍ & N. ACRECHE, 1996. Isozyme studies in Argentine species of the Section Strombocarpa, Genus *Prosopis* (Leguminosae). *J. Genetics* 75:139-149.
- SAIDMAN, B. O., J. C. VILARDI, S. MONTOYA & L. POGGIO, 1997. Genetic Variability and Ploidy level in species of *Prosopis* (Leguminosae). *Bol. Soc. Argent Bot.* 32 (3-4): 217-225.
- SAIDMAN, B. O., C. BESSEGA, L. FERREYRA & J. C. VILARDI, 1998a. Random amplified polymorphic DNA (RAPDS) variation in hybrid swarms and pure populations of genus *Prosopis*. In: Bruns, S., S. Mantell, C. Tragårdh & A. V. Viana (eds.) *Recent Advances in Biotechnology for Tree Conservation and Management*. Pp: 122-134. International Foundation for Sciences. Stockholm. ISBN: 91 85798 460.

- SAIDMAN, B. O., J. C. VILARDI, S. MONTOYA, M. J. DIEGUEZ & H. E. HOPP, 1998b. Molecular markers: a tool for the understanding of the relationships among species of *Prosopis* (Leguminosae, mimosoidae). In: Puri, S. (Ed.). *Tree Improvement: Applied Research and Technology Transfer*. Science Publishers Inc. U. S. A. Chapter 21:311-324.
- SIMPSON, B.B., 1977. Breeding system of dominant perennial plants of two disjuncts warm desert ecosystems. *Oecologia* 27:203-226.
- SIMPSON, B. B., J. L. NEFF & A. R. MOLDENKE, 1977. *Prosopis* flowers as a resource. En: BB Simpson (ed). *Mesquite: Its biology in two desert ecosystems, US/IBP synthesis Series Ch 5:84-107*. Dowden Hutchinson and Ross, Stroudsburg.
- WRIGHT, S., 1951. The genetical structure of populations. *Annals Eugenics* 15:323-354.
- WRIGHT, S., 1978. Evolution and the genetics of Populations, Vol 4. In: *Variability within and among natural populations*. University of Chicago Press, Chicago.

Recibido: 01/12/2000

Aceptado: 14/12/2000

