

TESIS DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

**“Análisis de la variabilidad del genoma cloroplástico y
caracterización cromosómica mediante hibridación *in situ* fluorescente en
especies sudamericanas del género *Lathyrus* L. (Sección *Notolathyrus*,
Leguminosae)”**

por

Lic. Laura María Isabel Chalup

**Director: Dr. José Guillermo Seijo
Co-Directora: Dra. Viviana Solís Neffa**

Instituto de Botánica del Nordeste



**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, FÍSICAS Y NATURALES
UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA**

Córdoba, Argentina

2013

COMISIÓN ASESORA

Aveliano Fernández, Instituto de Botánica del Nordeste (IBONE)

Juan Urdampilleta, Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal (IMBIV)

Guillermo Seijo, Instituto de Botánica del Nordeste (IBONE)

DEFENSA ORAL Y PÚBLICA

Lugar y Fecha:

Calificación:

TRIBUNAL

Firma:

Aclaración:

Firma:

Aclaración:

Firma:

Aclaración:

AGRADECIMIENTOS

A mi director, el Dr. Guillermo Seijo, por haberme brindado siempre los medios necesarios para llevar a cabo esta tesis y, por sobre todo, por su paciencia y dedicación en todos estos años.

A mi codirectora, la Dra. Viviana Solís Neffa, por la revisión del manuscrito, sus comentarios y sugerencias.

Al Ing. Aveliano Fernández, por la calidez de sus palabras.

A Germán, que le pone el hombro a todo, porque siempre pude contar con él.

A Sara, testigo de logros personales importantes, por haberme acompañado en el largo camino de las secuencias, por todas las horas de laboratorio compartidas y por su incondicionalidad de siempre.

A Betiana y Alejandra, que al estar unos pasos delante en el camino a seguir, siempre conté con ellas frente a cualquier duda.

A todos mis compañeros: Sara, Marina, Evelin, Gaby, Gise, Nati, Jona, Cele, Juanma, Álvaro, Diego, Sebastián y Yani por su colaboración y buena predisposición.

A Eve, Sara y Marina, por darme todo su apoyo y cariño en todo momento.

A Walter, por haberme acompañado y hecho más amena la búsqueda de ejemplares, sin él todavía estaría perdida en algún lugar.

A Mamá por su ejemplo, su temple, su constancia, su entereza frente a vida y sus fuerzas.

A Martín, por haberme escuchado siempre y por haber sumado mucho en varios aspectos a esta tesis.

A Sebastián, por su amor constante, su paciencia infinita, su apoyo, su confianza y su estímulo. A Julia, que hoy, a pesar de mucho está conmigo y que me demuestra que con su tamaño chiquitito no importa cuán grande es el problema, gracias por ser la cuota de dulzura y ternura de todos los días, por ser la recompensa de mis esfuerzos. A ambos, a Mamá, a Martín, a Katy y Gustavo por haber cedido su tiempo para dejar que “mamá trabaje”.

¡A todos, muchísimas gracias!

PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA TESIS

Chalup L., Grabiele M., Solis Neffa V. & Seijo G. 2012. Structural karyotypic variability and polyploidy in natural populations of the South American *Lathyrus nervosus* Lam. (Fabaceae). *Plant Systematic and Evolution*. 298: 4, 761-773, DOI: 10.1007/s00606-011-0587-z.

ÍNDICE

Resumen	1
Abstract	2
Introducción general	3
Objetivo General	7
Objetivos Específicos	7
<u>Capítulo I: Aspectos generales del género <i>Lathyrus</i></u>	9
Biología reproductiva y ciclos de vida	11
Importancia agronómica	13
Sección <i>Notolathyrus</i>	15
Material estudiado	18
<u>Capítulo II: Caracterización y evolución cromosómica de las especies de <i>Notolathyrus</i></u>	27
Introducción	28
Objetivo General	31
Objetivos específicos	31
Hipótesis	31
Materiales y Métodos	32
Análisis cariotípicos	33
Bandeo cromosómico fluorescente	33
Obtención de los preparados cromosómicos	33
Hibridación <i>in situ</i> fluorescente	34
Hibridación <i>in situ</i> fluorescente de los preparados cromosómicos	35
Adquisición de imágenes digitales	36
Confección de los idiogramas	36
Medición del contenido de ADN	37
Análisis estadísticos	38
Resultados	39
Números cromosómicos y análisis cariotípicos	39
Distribución de la heterocromatina	45
Genes ribosomales 45S y 5S	46

Contenido de ADN nuclear	50
Discusión	59
Características cariotípicas generales	59
Bandeo cromosómico	60
Mapeo de genes ribosomales	62
Contenido de ADN	64
<u>Capítulo III: Variabilidad cromosómica intraespecífica en poblaciones de</u>	
<i>Lathyrus nervosus</i>	66
Introducción	67
Objetivo General	68
Objetivos particulares	68
Hipótesis	69
Materiales y Métodos	70
Análisis de cromosomas somáticos	72
Análisis meiótico	72
Preparaciones cromosómicas	72
Análisis del comportamiento meiótico	72
Análisis de la viabilidad del polen	72
Resultados	73
Recuentos cromosómicos y análisis cariotípico en <i>L. nervosus</i>	73
Comportamiento meiótico y análisis de la viabilidad de polen	80
Discusión	85
Características generales del cariotipo	85
Bandeo cromosómico	85
Mapeo de genes ribosomales	86
Variación cariotípica entre las poblaciones	86
Autopoliploides en la sección Notolathyrus	87
Análisis de la microsporogénesis	88
<u>Capítulo IV: Filogenia</u>	90
Introducción	91
Objetivo General	93
Hipótesis	93
Materiales y Métodos	95

Análisis de secuencias	97
Extracción de ADN genómico	97
Amplificación de las regiones	98
Purificación y secuenciación	100
Análisis Filogenéticos	100
Resultados	101
Región cloroplástica intergénica trnS-trnG	101
Región ITS1-ITS2	107
Discusión	109
Relaciones filogenéticas interespecíficas de Notolathyrus	110
Capítulo V: Análisis de la variabilidad del ADN cloroplástico	113
Introducción	114
Objetivo General	116
Objetivos particulares	116
Hipótesis	117
Materiales y Métodos	118
Resultados	123
Variabilidad del ADNcp	123
Relaciones filogenéticas	132
Discusión	136
Variabilidad del ADNcp	136
Relaciones filogenéticas	140
Patrones de variabilidad haplotípica y nucleotídica	142
Consideraciones Finales	144
Referencias	148
Anexo	167

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Lista de especies de <i>Lathyrus</i> utilizadas, coleccionista, número de colección y procedencia	20
Tabla 2. Lista de las muestras de las especies de <i>Lathyrus</i> analizadas pertenecientes a las secciones <i>Notolathyrus</i> , <i>Lathyrus</i> y <i>Orobus</i>	32
Tabla 3. Fórmulas cariotípicas de las especies de <i>Lathyrus</i> analizadas	40
Tabla 4. Resumen de las características cromosómicas de las especies de <i>Lathyrus</i>	41
Tabla 5. Características cariotípicas de las especies de <i>Lathyrus</i> obtenidas por bandeo fluorescente DAPI e hibridación <i>in situ</i> fluorescente de ADNr 5S y 45S	43
Tabla 6. Contenido de ADN 2C en las especies de <i>Lathyrus</i> analizadas	51
Tabla 7. Lista de las poblaciones de <i>Lathyrus nervosus</i> analizadas, su proveniencia, el tipo de análisis realizado y el número de individuos con diferentes números cromosómicos hallados en cada una de las poblaciones estudiadas	70
Tabla 8. Características cariotípicas de las poblaciones de <i>Lathyrus nervosus</i>	76
Tabla 9. Análisis meiótico en poblaciones de <i>Lathyrus nervosus</i> (60 y 63)	81
Tabla 10. Tipos de esporadas observadas e índice meiótico (IM) de dos poblaciones de <i>Lathyrus nervosus</i>	83
Tabla 11. Análisis del polen en diferentes poblaciones de <i>Lathyrus nervosus</i>	83
Tabla 12. Listado de especies utilizadas para los distintos análisis filogenéticos	95
Tabla 13. Lista de especies utilizadas como grupo externo en los análisis filogenéticos y de variabilidad cloroplástica	97
Tabla 14. Cebadores utilizados para amplificar las regiones de ADNcp y ADNn	98
Tabla 15. Características de las secuencias trnS-trnG e ITS1-ITS2 para las 29	102

taxones de *Lathyrus* y *Vicia* analizadas

Tabla 16. Detalle de los indels observados en la región cloroplástica intergénica trnS-trnG de las especies de <i>Lathyrus</i> y <i>Vicia</i> analizadas	103
Tabla 17. Listado del material estudiado y de los haplotipos encontrados	119
Tabla 18. Estadísticos de diversidad genética hallada en la región trnS-trnG de ADNcp por especie	130
Tabla 19. Estadísticos de diversidad genética hallada en la región ITS1-ITS2 de ADNn por centros de riqueza específica	131

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribución geográfica del género	5
Figura 2. Comparación de las seis clasificaciones históricas del género <i>Lathyrus</i>	12
Figura 3. Comparación de la morfología entre especies anuales y perennes de <i>Lathyrus</i>	14
Figura 4. Centros de riqueza específica de la sección <i>Notolathyrus</i>	17
Figura 5. Detalle de las inflorescencias de algunas de las especies de la sección <i>Notolathyrus</i>	19
Figura 6. Patrones de bandas CMA ⁺ /DAPI ⁰ en algunas especies de <i>Lathyrus</i>	47
Figura 7. Patrones de bandas CMA ⁰ /DAPI ⁺ en diferentes especies de <i>Notolathyrus</i>	48
Figura 8. Patrones de bandas obtenidos por tinción directa con CMA ⁰ /DAPI ⁺ en algunas especies de las secciones <i>Lathyrus</i> y <i>Orobus</i>	49
Figura 9. Doble hibridación <i>in situ</i> fluorescente con sondas ribosomales en metafases somáticas de algunas especies de la sección <i>Notolathyrus</i>	52
Figura 10. Doble hibridación <i>in situ</i> fluorescente con sondas ribosomales en metafases de especies de las secciones <i>Lathyrus</i> y <i>Orobus</i>	54
Figura 11. Idiogramas de las especies analizadas de la sección <i>Notolathyrus</i>	55
Figura 12. . Idiogramas de las especies analizadas de las secciones <i>Lathyrus</i> y <i>Orobus</i>	56
Figura 13. Diagrama de dispersión de los índices de asimetría A ₁ y A ₂ de Romero Zarco (1986) Idiogramas de las especies analizadas de las secciones <i>Lathyrus</i> y <i>Orobus</i>	57

Figura 14. Histogramas de contenido de ADN de las especies de <i>Lathyrus</i> analizadas, obtenidos por análisis de citometría de flujo de núcleos teñidos con PI	58
Figura 15. Distribución geográfica de <i>Lathyrus nervosus</i>	71
Figura 16. Metafasas de individuos de diferentes poblaciones de <i>Lathyrus nervosus</i> con bandeado CMA-DAPI	77
Figura 17. Doble hibridación <i>in situ</i> fluorescente con sondas ribosomales de individuos de distintas poblaciones de <i>L. nervosus</i>	78
Figura 18. Idiogramas de las poblaciones estudiadas de <i>Lathyrus nervosus</i>	79
Figura 19. Células en división meiótica de la población 60	82
Figura 20. Granos de polen de la población 60 de <i>Lathyrus nervosus</i>	84
Figura 21. Árbol de consenso estricto resultado del análisis de parsimonia a partir de una matriz de datos combinada de las regiones cloroplásticas rpoC e IR	92
Figura 22. Árboles filogenéticos publicados por Kenicer <i>et al.</i> (2005)	94
Figura 23. Árbol consenso de los 12 árboles más parsimoniosos obtenido a partir de las secuencias intergénicas cloroplásticas trnS-trnG (regla de la mayoría).	106
Figura 24. Árbol consenso obtenido de los 4 árboles más parsimoniosos construidos a partir de secuencias ITS1-ITS2 (regla de la mayoría)	108
Figura 25. Mapa de las localidades de los individuos y los centros de riqueza específica estudiados	124
Figura 26. Gel de la región trnS-trnG amplificada de <i>Lathyrus pubescens</i>	126
Figura 27. Mapa de las áreas de distribución de las especies con haplotipos compartidos	126
Figura 28. Mapas de los centros de riqueza específica indicando la distribución de los haplotipos observados	127

Figura 29. Mapas de los centros de riqueza específica indicando la distribución de los haplotipos observados	128
Figura 30. Árbol consenso obtenido a partir de 98 árboles más parsimoniosos siguiendo el criterio de la mayoría	134

ABREVIATURAS

ADN - ácido desoxirribonucleico

ADNcp - ácido desoxirribonucleico cloroplástico

ADNn - ácido desoxirribonucleico nuclear

ADNr - ácido desoxirribonucleico ribosomal

AMOVA - análisis molecular de la varianza

ANOVA - análisis de la varianza

AMP - árbol más parsimonioso

ARNasa - ribonucleasa

BP- centro de riqueza específica bosques patagónicos

BS - Bootstrap

BSA - albumina de suero bovino (*bovine serum albumine*)

CMA - cromomicina A3

CMP - Células madres del polen

CRPU - centro de riqueza específica de las cuencas de los ríos Paraná y Uruguay

DAPI - 4-6-diamidino-2-fenilindol

dNTP - desoxirribonucleotido trifosfato

dUTP – desoxiuracilo trifosfato

EDTA - ácido etilendiaminotetraacético

FISH - hibridación in situ fluorescente (*fluorescence in situ hybridization*)

GC - grano de polen coloreado

GCA - grano de polen coloreado anormal

GCM - grano de polen coloreado de tamaño mediano

GNC - grano de polen no coloreado

h - hora

IC - índice de consistencia

IGS - secuencias intergénicas (intergenic spacer) de los genes ARNr 45S

IM - índice meiótico

IR - índice de retención

Kb- kilobase

m - metacéntrico

M - molar

MaG - Macrograno de polen

MiG - Micrograno de polen
MANOVA- análisis de la varianza multivariado
mg - miligramos
min - minutos
ml - mililitros
mM - milimolar
Mpb - millón de pares de bases
ng - nanogramos
pb - pares de bases
PI - sitios parsimoniosamente informativos
p/v - peso en volumen
PBS - solución tampón de fosfato (*phosphate buffered saline*)
PCR - reacción en cadena de la ADN polimerasa
pg - picogramos
S- sitios polimorficos
s – segundos
SBUB- centro de riqueza específica de las sierras de Buenos Aires, Uruguay y Brasil
SDS - dodecil sulfato de sodio
sm – submetacéntrico
SSAC- centro de riqueza específica de las sierras subandinas y cordobesas
SSC - saline-sodium citrate, tampón citrato sódico salino
st - subtelocéntrico
TAE - tampón Tris-ácido acético-EDTA
Tris - N-Tris-(hidoximetil)-aminoetano
U – unidades
UV- ultravioleta
v/v - volumen en volumen
vol - volúmenes
x - número cromosómico básico de una especie
× - proporción de concentración en soluciones
μg - microgramos
μl - microlitros
μM - micromolar
2n - número cromosómico somático

2x - diploide

3x - triploide

4x – tetraploide

RESUMEN

En esta tesis se analizaron los cariotipos de 11 especies de *Notolathyrus* y cuatro de otras secciones de *Lathyrus*. Estos análisis permitieron identificar marcadores cromosómicos particulares para especies y secciones. Los patrones de heterocromatina fueron variables entre las especies pero, en general, las especies anuales y las de distribución subtropical presentaron menos heterocromatina. El número de *loci* ADNr 45S y 5S fue uniforme para las especies de *Notolathyrus*. La posición de los *loci* 45S fue uniforme y diagnóstica para este grupo, mientras que la posición de los *loci* 5S fue particular para cada especie. Se detectaron variaciones significativas en el contenido ADN entre las especies; las anuales con menor contenido que las perennes. La variación del contenido de ADN no se correlacionó con la variación en la fracción de heterocromatina observada entre las especies, lo que sugirió que las variaciones cuantitativas del ADN en *Notolathyrus* han ocurrido tanto en la heterocromatina como en la eucromatina.

El análisis cromosómico intraespecífico reveló la existencia de variabilidad tanto estructural (en el patrón de bandas heterocromáticas DAPI⁺) como numérica entre los individuos y poblaciones de *L. nervosus*, registrándose por primera vez poliploides en *Notolathyrus*. El análisis de las esporadas y granos de polen sustenta que el mecanismo más probable del origen de estos poliploides sería la autoploidización sexual.

Los estudios filogenéticos usando ADNcp y ADNn de 17 taxones sudamericanos y de nueve especies de otras secciones del género sustentan la monofilia de *Notolathyrus*. Si bien estos análisis no fueron muy resolutivos a nivel de especie, constituyen el primer aporte que revela las relaciones existentes entre algunos grupos de especies de *Notolathyrus*, consistentes con la morfología de los frutos pero no con la distribución geográfica de los taxones. Los resultados obtenidos cuestionan la hipótesis del origen del grupo a partir de la sección *Orobus* y plantean su relación más estrecha con las especies del Mediterráneo.

El análisis de la región trnS-trnG en 96 muestras de *Notolathyrus* mostró una alta variabilidad haplotípica y nucleotídica dentro y entre especies, independientemente del tamaño del área de distribución de las mismas. Asimismo, la variabilidad detectada no presentó una relación con la procedencia geográfica de las muestras. Sin embargo, demostró que los centros de riqueza específica propuestos son también centros de variabilidad genética.

ABSTRACT

In this thesis, the karyotypes of 11 species of *Notolathyrus* and four belonging to other sections of *Lathyrus* were analyzed. These analyses allowed the identification of particular chromosomal markers for each species and sections. Heterochromatin patterns were variable among species; however, in general, annuals and subtropical species had less amount of heterochromatin. The number of 45S and 5S rDNA *loci* was uniform for *Notolathyrus* species. The position of the 45S rDNA *loci* was uniform and diagnostic for this group, while the position of the 5SrDNA *loci* was particular to each species. Significant changes in the DNA content among species were detected, annual species having less DNA content than perennial ones. The variation in DNA content was not correlated with the variation in the fraction of heterochromatin, suggesting that the quantitative changes of DNA in *Notolathyrus* have occurred in heterochromatin and in euchromatin.

Intraspecific chromosomal analysis revealed the existence of structural and numerical variability among individuals and populations of *L. nervosus*, revealing the existence of polyploids in *Notolathyrus*. The analysis of pollen grains and sporads supports sexual autopolyploidization as the most probable origin of the polyploid cytotypes.

Phylogenetic studies using cpDNA and nDNA of 17 South American taxa and ten outgroups support the monophyly of *Notolathyrus*. Despite that the phylogenetic analyses were not well resolved at the species level, they are the first contributions that reveals the relationships between some groups of Southamerican species, consistent with the morphology of the fruits but not with geographic distribution of species. The results argue the hypothesis that considers the origin of *Notolathyrus* from section *Orobus* and suggest a closer relationship with Mediterranean species.

The analysis of the region trnS-trnG in 96 samples of *Notolathyrus* showed high haplotype and nucleotide variability within and among species, regardless of the size of their distribution ranges. The variability detected showed no relationship with the geographical origin of the samples, however, it demonstrated that the proposed centers of species richness are also centers of genetic variability.

INTRODUCCIÓN GENERAL

L*athyrus* L. pertenece a la familia Leguminosae, subfamilia Papilionoideae, tribu Fabeae. El género incluye alrededor de 160 especies que se distribuyen principalmente en las zonas templadas del Hemisferio Norte, extendiéndose hacia África tropical y Sudamérica (Kupicha 1983). El principal centro de distribución específica se encuentra en la región Mediterránea y existen dos centros secundarios de distribución en Norteamérica y Sudamérica (Fig. 1).

En Sudamérica crecen alrededor de 23 especies endémicas, todas ellas incluidas en una única sección, *Notolathyrus* (Burkart 1942, Kupicha 1983). Muchas de estas especies presentan características morfológicas muy variables y, a su vez, caracteres comunes con especies de otras secciones. La amplia variabilidad morfológica intraespecífica, las distribuciones disyuntas de las poblaciones de algunas especies y la falta de caracteres diagnósticos han dificultado históricamente la delimitación de algunos de los taxones de este grupo. A pesar de que la taxonomía ha sido tratada tempranamente (Burkart 1935, 1942), aún existen especies y variedades taxonómicas que no se hallan bien establecidas (Rossow 1982, Seijo 2002, Vanni 2005) y especies cuya identidad es dudosa (Rossow 1982).

Desde el punto de vista citológico, la mayoría de las especies de *Notolathyrus* son diploides ($x = 7$) y cromosómicamente muy semejantes cuando los cariotipos son analizados con técnicas clásicas (Senn 1938, Klamt y Schifino-Wittmann 2000, Seijo y

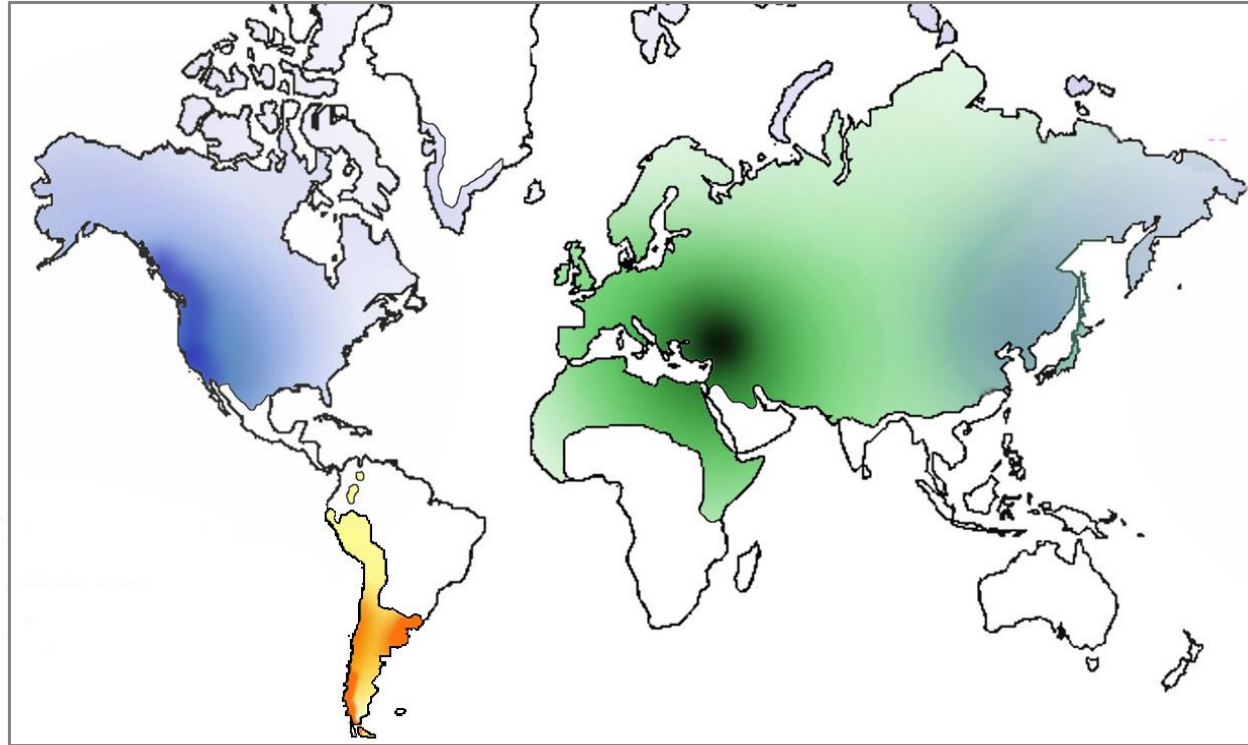


Figura 1. Distribución geográfica del género. Los distintos colores indican los diferentes centros de distribución geográfica en el mundo. La intensidad de los colores en cada centro indica la diversidad específica.

Fernández 2003). En diversos grupos de plantas, la detección de heterocromatina en los cariotipos por medio de técnicas de bandeado con fluorocromos (Guerra 2000), el mapeo de *loci* ribosomales por hibridación *in situ* fluorescente (Moscone *et al.* 1999, Hizume *et al.* 2000), así como el análisis meiótico (Dewitte *et al.* 2010), han provisto marcadores cromosómicos útiles para esclarecer problemas taxonómicos y para realizar inferencias sobre los mecanismos de evolución cromosómica que operan en dichos grupos. Sin embargo, en *Notolathyrus*, aún no se han realizado investigaciones que permitan revelar la subestructura cromosómica de estas especies para desarrollar marcadores cromosómicos diagnósticos que permitan investigar el rol de los cambios cromosómicos en la evolución intra e interespecífica.

Por otra parte, a pesar de la similitud cariotípica y de la constancia en el número cromosómico citadas para la sección *Notolathyrus*, las especies presentan diferencias significativas en la longitud de los complementos cromosómicos (Klamt y Schifino-Wittmann 2000, Seijo y Fernández 2003). Esto sugiere que las especies presentan un amplio rango de variación en el tamaño genómico. Este hecho convierte al grupo en un modelo biológico apropiado para inferir el rol del cambio en el contenido de ADN en la evolución cromosómica. En este sentido, la determinación de los contenidos de ADN por citometría de flujo se ha convertido en una de las técnicas más utilizadas para generar información apropiada para abordar este tipo de estudio (Doležel *et al.* 1992).

Las interpretaciones evolutivas, especialmente aquellas referidas al origen y diversificación de los taxones sudamericanos, han estado afectadas por la presencia de muchos caracteres plesiomórficos dentro de la sección (Kupicha 1983). Por lo que no se han establecido las relaciones evolutivas entre las especies de *Notolathyrus* y las propuestas filogenéticas para el grupo, en el contexto del género, son conflictivas (Simola 1968, Kupicha 1983, Asmussen y Liston 1998, Kenicer *et al.* 2005). De los seis análisis filogenéticos realizados hasta el momento en el género *Lathyrus* (Croft *et al.* 1999, Chtourou-Ghorbel *et al.* 2001, Badr *et al.* 2002, Ben Brahim *et al.* 2002, Kenicer *et al.* 2005) solamente dos han incluido unas pocas especies sudamericanas (Asmussen y Liston 1998, Kenicer *et al.* 2005) y los resultados obtenidos son disímiles. El análisis filogenético utilizando secuencias de ADNcp y ADNn de un mayor número de especies podría aportar datos tanto para el esclarecimiento de las relaciones interespecíficas dentro de la sección como de la posición de la misma con respecto a las demás secciones del género.

Los análisis realizados hasta el momento sobre la variabilidad genética en *Lathyrus* han incluido sólo a pocas especies, principalmente a la especie cultivada *L. sativus* L. y, en

ningún caso, se han incluido a especies sudamericanas (Croft *et al.* 1999, Belaïd *et al.* 2006). Las especies de *Notolathyrus* se distribuyen ampliamente en el oeste, centro y sur de Sudamérica, habiéndose reconocido tres centros de riqueza específica (Burkart 1935, Seijo 2002). Además, las especies de este grupo presentan extensión del área de distribución y densidad de población variables, así como distintos ciclos de vida y sistemas de reproducción (Burkart 1935, 1942). Algunas especies muestran poblaciones densas, con amplia distribución y variedades segregadas geográficamente –como *L. magellanicus* Lam.–; y otras poseen distribución restringida (con menos de 5 localidades conocidas), con poblaciones pequeñas y uniformes –como *L. linearifolius* Vog. y *L. paraguariensis* Burk.– (Seijo 2002). Las especies pueden ser anuales y autógamas (*L. crassipes* Hook. *et* Arn.) o perennes y alógamas (*L. pubescens* Hook. *et* Arn., *L. magellanicus*). Estas características diferenciales de las poblaciones estarían determinando diferentes patrones de variabilidad genética entre y dentro de las especies, así como entre y dentro de los centros de riqueza específica. En general, el análisis de secuencias de ADNcp provenientes de diferentes localidades de distintas especies de grupos de plantas, provee una primera aproximación sobre la variabilidad genética existente en el grupo (Matthew y Soltis 1999).

En el marco de los antecedentes expuestos, en esta tesis se plantean los siguientes objetivos:

Objetivo general

“Contribuir al conocimiento de los patrones de diversidad cromosómica y cloroplástica de Notolathyrus e inferir la historia evolutiva del grupo”.

Objetivos específicos

- 1- Caracterizar cariotípicamente a las especies de *Notolathyrus* e investigar los patrones de evolución cariotípica mediante el análisis comparativo y detallado de distintos marcadores cromosómicos y del contenido de ADN genómico de estos taxones.
- 2- Inferir los mecanismos de evolución cromosómica a nivel poblacional.
- 3- Inferir las relaciones filogenéticas existentes entre las especies sudamericanas y aportar datos sobre su origen.
- 4- Estimar la variabilidad genética existente dentro del grupo.

En el Capítulo I se presentan los aspectos generales del género *Lathyrus* y en particular de la sección *Notolathyrus*. Se describe su taxonomía, distribución geográfica, biología

reproductiva, ciclos de vida y hábitos, como así también su importancia agronómica. También se incluye la Tabla en las que se detalla el material utilizado para la realización de esta tesis. En el Capítulo II, se presentan los resultados obtenidos del análisis cariotípico realizado mediante bandeo CMA/DAPI, hibridación *in situ* fluorescente de genes ribosomales y contenido de ADN, y se discuten los mecanismos de diferenciación cromosómica interespecífica que habrían operado en la sección *Notolathyrus*. En el Capítulo III, se analiza la variabilidad cariotípica existente a nivel intraespecífico tomando como modelo a *Lathyrus nervosus* Lam., una de las especies sudamericanas con mayor distribución geográfica. Asimismo, se analiza el comportamiento meiótico y la viabilidad del polen en algunas poblaciones de esta especie con el fin de inferir las causas de la variación cariotípica intraespecífica y sus posibles consecuencias a nivel de la viabilidad del polen. En el Capítulo IV, se infieren las relaciones filogenéticas existentes entre las especies de la sección *Notolathyrus* y, entre esta sección y las otras secciones del género, utilizando secuencias de ADNcp y de ADNn. Posteriormente, en el Capítulo V, se analiza la variabilidad existente tanto entre y dentro de las especies, como entre y dentro de los centros de riqueza específica, utilizando secuencias de ADNcp. Finalmente, se presentan las consideraciones finales donde se resumen las conclusiones más importantes de cada Capítulo.

CAPÍTULO I

ASPECTOS GENERALES DEL

GÉNERO *Lathyrus*

El género *Lathyrus* (arvejillas) integra la tribu Fabeae (sin. Vicieae) junto con los géneros *Vicia* L. (habas), *Lens* Mill. (lentejas), *Pisum* L. (arvejas) y *Vavilovia* A. (Kupicha 1981).

Hasta la clasificación de Godron (1848), los géneros lineanos *Lathyrus* y *Orobus* fueron aceptados por los diferentes taxónomos. Este autor unió los dos géneros en uno solo (*Lathyrus*) y establece que el mismo se caracteriza por presentar un estilo dorsalmente comprimido con pubescencia en la cara adaxial. Infragenéricamente, organiza al género en seis secciones: *Eulathyrus*, *Cicerula*, *Clymenum*, *Nissolia*, *Aphaca* y *Orobus*. Posteriormente, en 1872 Boissier segregó nuevamente a *Orobus* como género, incluyendo en él a todas las especies sin zarcillos que componían a la sección homónima (*sensu* Godron 1848). Por otra parte, aquellos miembros de *Orobus* (*sensu* Godron 1848) que presentaban zarcillos permanecieron como integrantes del género *Lathyrus* dentro de la sección *Orobastrum*. En 1966, Bässler propuso a *Orobus* como un subgénero de *Lathyrus* e incluyó dentro de éste a las secciones *Orobus*, *Lathyrstylis*, *Orobon*, *Pratensis*, *Euritrycon* y *Neurolobus*. Sobre esta estructuración, Davis (1970) incluyó a las especies anuales excluidas del subgénero *Orobus* en la sección *Orobastrum*. Un año más tarde, Czefranova (1971) realizó un tratado únicamente de especies europeas y asiáticas. Esta autora dividió a *Lathyrus* en seis subgéneros: *Orobus*; *Lathyrus*, *Clymenum*, *Nissolia*, *Cicerula* y *Aphaca*. El Subgénero *Orobus* quedó conformado por cinco secciones: *Orobus*, *Lathyrobus*, *Pratensis*, *Euritrycon* y *Neurolobus*. La última revisión, y la más comprensiva, fue realizada por Kupicha (1983) quien organizó infragenéricamente a *Lathyrus* en 13 secciones (Fig. 2) en base a caracteres morfológicos cuali y cuantitativos. Esta autora agrupó a todas las especies de Sudamérica y a *L. pusillus* Ell. de Norteamérica en una sección diferente a la que denominó *Notolathyrus* (Fig. 2).

Los análisis morfo-anatómicos (Kupicha 1975, Gunn y Kluge 1976), cromosómicos (Ünal *et al.* 1995, Ali *et al.* 2000, Seijo y Fernández 2003) y moleculares (Asmussen y Liston 1998, Kenicer *et al.* 2005) abarcando especies representativas de todo el género o de secciones en particular han validado, en general, la clasificación infraespecífica propuesta por Kupicha (1983) aunque las relaciones entre las secciones y los límites de algunos de estos grupos aún es motivo de debate.

Biología reproductiva y ciclos de vida

Lathyrus está compuesto en su totalidad por especies herbáceas de las cuales alrededor de 40 son anuales y 120 son perennes. Las especies pueden tener tallos erectos (sin zarcillos o con zarcillos reducidos) o más usualmente con tallos trepadores (con zarcillos) o postrados; siendo las especies anuales de aspecto más delicado que las perennes (Kupicha 1983) (Fig. 3).

Algunas de las especies de *Lathyrus* son autógamas, mientras que otras son alógamas. En general, las especies anuales de *Lathyrus* tienden a ser autógamas mientras que las perennes tienden a ser alógamas, y polinizadas frecuentemente por insectos. Las especies anuales se caracterizan por presentar pocas flores (1-2) por inflorescencia, en general, de escaso tamaño y de colores pálidos u oscuros, mientras que las especies perennes presentan inflorescencias densas (5-7 flores por racimos) con flores de gran tamaño, de colores brillantes que, por lo general, producen néctar (Kupicha 1983, Hossaert *et al.* 1986, Ben Brahim *et al.* 2001).

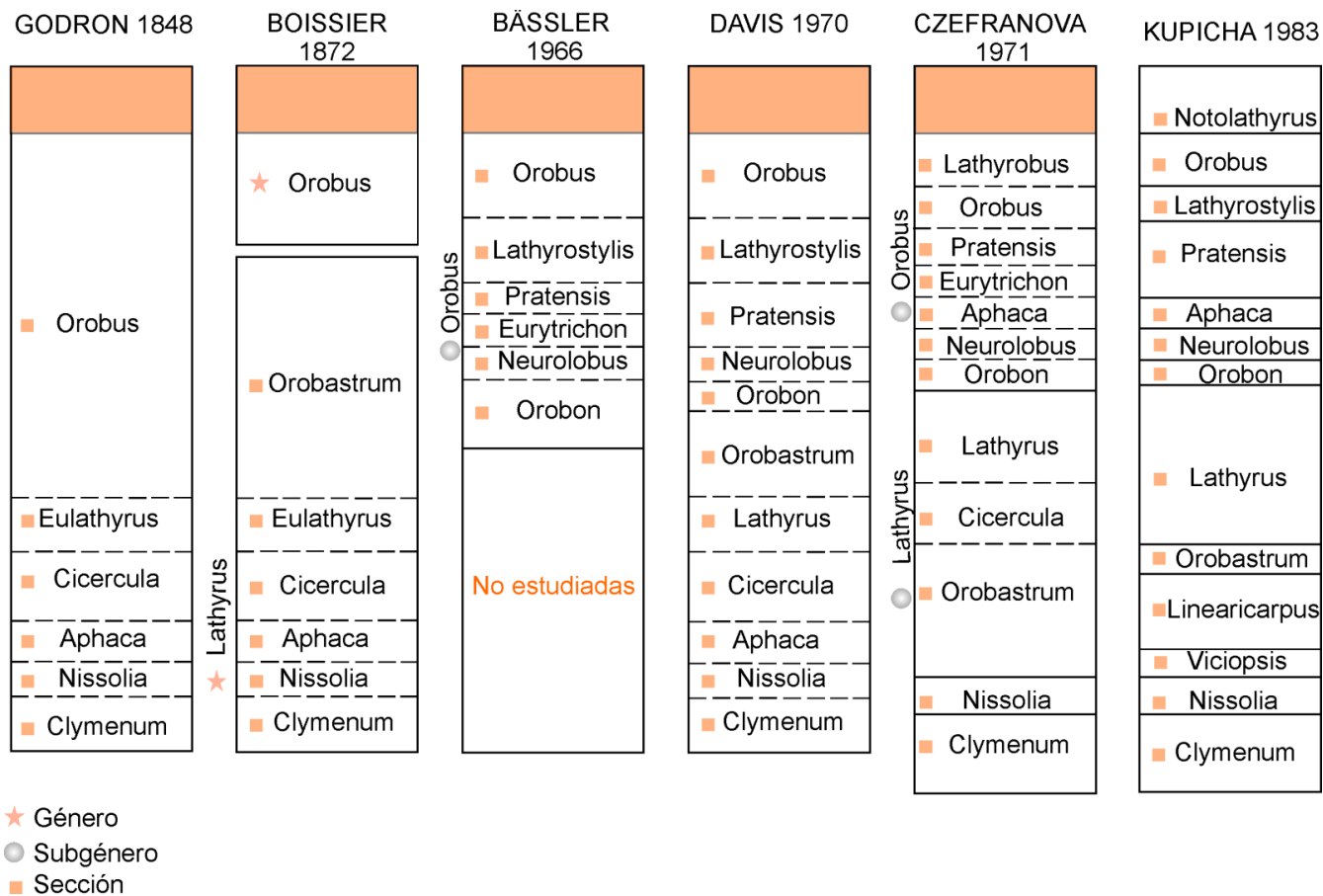


Figura 2. Comparación de las seis clasificaciones históricas del género *Lathyrus*. Extraído de Kupicha (1983).

Importancia agronómica

Varias especies de *Lathyrus* pertenecen al grupo de las primeras plantas domesticadas del mundo y son componentes característicos del complejo de plantas comestibles del Neolítico en el cercano oriente (Kislev 1989). Actualmente, las especies que se utilizan para el consumo humano son *L. cicera* L. y *L. sativus*. *Lathyrus sativus* es utilizada principalmente en India, Bangladesh, Nepal, Pakistán y Etiopía (Vaz-Patto y Rubiales 2009), siendo valorada por su alto valor proteico (de 18-34 % del peso seco en grano, y 17 % en hojas maduras) y por su alto contenido de lisina (Rosa *et al.* 2000).

Otras especies, como *L. pratensis* L., *L. ochrus* (L.) DC. y *L. articulatus* L., son utilizadas para forraje. Si bien estas especies presentan un gran potencial como cultivos de rotación para mejorar las condiciones físico-químicas del suelo, reducir las malezas y enfermedades, tolerar condiciones de baja precipitación y por ende disminuir los costos de producción, no se encuentran ampliamente difundidas (Ben Brahim *et al.* 2001, Vaz Patto *et al.* 2006, Kozak *et al.* 2008). En cuanto a las especies sudamericanas, todas pueden considerarse como forrajeras naturales, pero resisten poco al pastoreo (Burkart 1935) y ninguna es utilizada comercialmente para estos fines.

En lo que respecta a especies y cultivares de *Lathyrus* utilizadas como plantas ornamentales, más de 70 especies (alrededor del 50 % del género) están disponibles comercialmente en muchos países del mundo. Las especies ornamentales más importantes son *L. odoratus* L., *L. latifolius* L. y *L. sylvestris* L. (todas de la sección *Lathyrus*), con más de 100 variedades. Otras especies de importancia ornamental son *L. grandiflorus* Sibth y Smith y *L. rotundifolius* Willd. (secc. *Lathyrus*) *L. aureus* (Steven) Brandza y *L. vernus* Bernh. (secc. *Orobus*) (Kenicer 2008). Si bien la mayoría de las especies comercialmente importantes son europeas, algunas especies sudamericanas han sido introducidas a diversos países del Hemisferio Norte y están siendo cultivadas comercialmente. *Lathyrus nervosus*, es regularmente utilizada en los jardines del Reino Unido (Kenicer 2008) y *Lathyrus pubescens* y *L. magellanicus* han sido introducidas en Norteamérica, donde se comercializa el cultivar Lord Anson's White de flores blancas (Kenicer 2008).



Figura 3. Comparación de la morfología entre especies anuales y perennes de *Lathyrus*. Anual: **A:** *L. crassipes*. Perennes: **B:** *L. latifolius*, **C:** *L. macropus*, **D:** *L. macrostachys*.

Sección *Notolathyrus*

Las primeras especies sudamericanas conocidas fueron coleccionadas por Commerson en Uruguay y Buenos Aires en el año 1767 y descritas por Lamarck (1786-88). Otras especies fueron descritas por Hooker y Arnott (1831-1833), Vogel (1839), Closs en Gay (1846) y Burkart (1935-1942). Algunas otras especies fueron descritas incidentalmente por otros botánicos que no han tratado al grupo.

En 1935, Burkart realiza la revisión de las especies de Argentina y en 1942 de las especies de Sudamérica. En estos trabajos reconoce 23 especies nativas y señala que la escasa cantidad de caracteres diagnósticos dificulta la identificación de los taxones tanto a nivel interespecífico como intraespecífico. Un ejemplo de especies difíciles de delimitar corresponde al grupo formado por *L. macrostachys* Vog., *L. paranensis* Burk. y *L. nigrivalvis* Burk. que presentan caracteres morfológicos muy similares.

Por otra parte, a nivel infraespecífico, tanto el número (4 ó 5) como los límites de las variedades de *L. magellanicus* son controversiales (Burkart 1935, Rossov 1982). Asimismo, la variabilidad morfológica existente dentro de las especies y la distribución disyunta de las poblaciones co-específicas plantean otro desafío para la correcta interpretación de las especies. El caso más sobresaliente corresponde a las poblaciones de *L. crassipes* de Sudamérica y *L. pusillus* de Norteamérica separadas por varios miles de kilómetros, y que algunos autores (Kupicha 1983, Kenicer *et al.* 2005) las consideran como la misma especie bajo el nombre de *L. pusillus*.

Las especies de *Notolathyrus* se extienden desde Colombia hasta Tierra del Fuego, Argentina y desde la costa Atlántica hasta la costa Pacífica; abarcando principalmente Argentina, centro, sur de Chile y Uruguay y sur de Brasil. Se han propuesto tres centros principales de riqueza específica para Sudamérica: 1- las cuencas de los ríos Paraná y Uruguay (CRPU) que incluye a las provincias del litoral Argentino, y las regiones adyacentes al río Uruguay en Brasil y Uruguay, 2- las sierras de Buenos Aires, Uruguay y sur de Brasil (SBUB) y 3- los bosques patagónicos (BP) (Burkart 1935, Rossov 1982, Seijo 2002) (Fig. 4). Fuera de estos centros existen especies características de las zonas montañosas y templadas de toda América del Sur, llegando hasta Colombia (Burkart 1935). Los principales factores ecológicos que gobiernan la distribución de las especies son el régimen hídrico (debido a que todas son higrófilas en mayor o menor medida) y la exposición a la radiación solar (Burkart 1935). Se las pueden encontrar en ambientes tan diversos como valles interandinos, campos de altura, quebradas serranas, bordes y claros

de selvas y turberas. No se las encuentran en la región Amazónica, la Caatinga, el Cerrado y el Chaco seco (Seijo 2002).

En Argentina se han registrado 20 especies de *Lathyrus*, por lo que es el país sudamericano con mayor riqueza de especies (Burkart 1935, 1942). En Chile se reconocen unas 15 especies (Marticorena y Quesada 1985), en Brasil alrededor de 12 especies concentradas en la parte sur (Neubert y Miotto 2001) y en Uruguay diez especies (Izaguirre y Byhaut 1997). En los demás países como Bolivia, Perú, Ecuador y Colombia la sección está representada sólo por unas pocas especies.

Con respecto al origen de las especies sudamericanas de *Lathyrus* se han propuesto tres hipótesis. Simola (1968) plantea que los taxones sudamericanos son ancestrales de las cuales habrían derivado las especies del viejo mundo. Las otras dos hipótesis proponen que la sección *Notolathyrus* es derivada. Sin embargo, una de ellas considera que los taxones sudamericanos habrían derivado de las especies que viven en la región irano-turca, implicando procesos de dispersión a distancia (Kenicer *et al.* 2005); mientras que la otra considera que las especies de *Notolathyrus* habrían derivado de las especies norteamericanas y que la radiación en Sudamérica fue posterior a la aparición del Istmo de Panamá (Burkart 1935, 1942, Kupicha 1983, Asmussen y Liston 1998). Hasta el momento, no se han generado datos concluyentes que permitan sustentar inequívocamente a alguna de estas hipótesis.

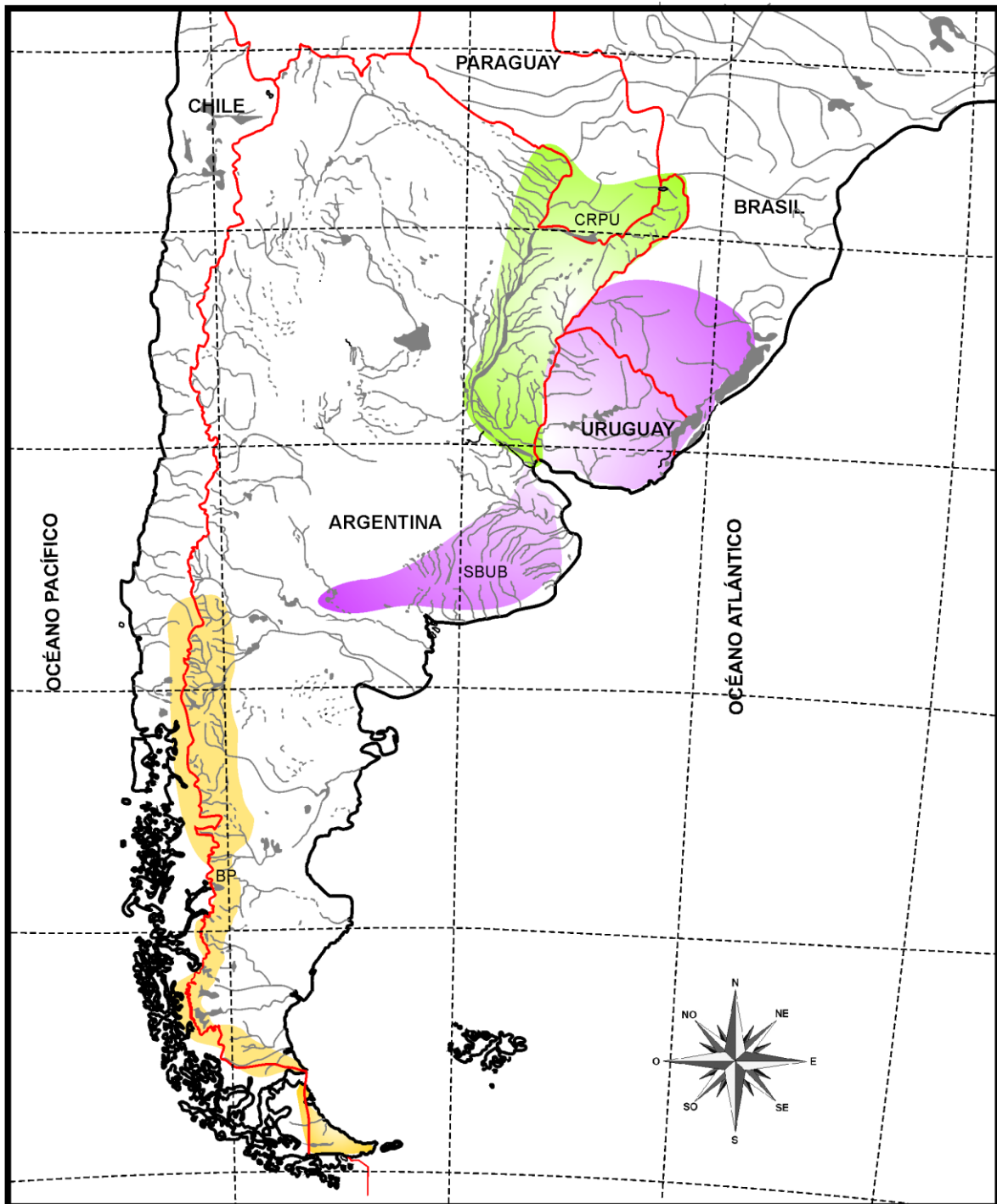


Figura 4. Centros de riqueza específica de la sección *Notolathyrus*. Las zonas coloreadas corresponden a los centros de riqueza específica. En verde se muestra el centro de las cuencas de los ríos Paraná y Uruguay (CRPU), en lila el de las sierras de Buenos Aires, Uruguay y sur de Brasil (SBUB) y en amarillo el de los bosques patagónicos (BP). Adaptado de Burkart (1935) y Seijo (2002)

MATERIAL ESTUDIADO

El material utilizado para el desarrollo de esta tesis se ha obtenido a partir de plantas coleccionadas en las provincias de Corrientes, Misiones, Neuquén, Río Negro, Chubut, Santa Cruz y Tierra del Fuego en Argentina, y Provincia Última Esperanza en Chile. En cada colección se realizaron ejemplares de herbario para la identificación taxonómica de los especímenes y la documentación del material utilizado. Todos los ejemplares se encuentran depositados en el Herbario del Instituto de Botánica del Nordeste (CTES) y los duplicados disponibles han sido distribuidos a distintas instituciones de Argentina y del exterior. También, se han incorporado a este estudio material de distintas localidades de Brasil, Uruguay y de otras provincias de Argentina coleccionados con anterioridad por otros investigadores del IBONE, y en algunos casos se utilizaron ejemplares de herbario de distintos coleccionistas de otras instituciones. Además se utilizaron, con fines comparativos, especies de otras secciones. La lista completa de los materiales utilizados en esta tesis con los datos de los coleccionistas y las localizaciones geográficas se muestra en la Tabla 1. En la Figura 5 se ilustran algunos de las especies de la sección *Notolathyrus* analizadas.



Figura 5. Detalle de las inflorescencias de algunas de las especies de la sección *Notolathyrus*. **A:** *L. crassipes*, **B:** *L. hasslerianus*, **C:** *L. macropus*, **D:** *L. macrostachys*, **E:** *L. magellanicus* var. *glauscegens*, **F:** *L. magellanicus* var. *magellanicus*, **G y H:** *L. nervosus*, **I:** *L. nigrivalvis*, **J:** *L. paranensis*, **K:** *L. pubescens*, **L:** *L. subulatus*.

Tabla 1. Lista de especies de *Lathyrus* utilizadas, coleccionista, número de colección y procedencia.

^a: Bo: O. Boelcke, C: A. Cocucci, Ca: R. Carnevalli, Ce: M. Cerana, Ch: L. Chalup, G: E. Gómez, Go: A. González, H: A. Hunziker, K: A. Krapovickas, Ku: Kurtz, Le: A. Lemke, Ma: C. Macluf, Me: W. Medina, Mo: O. Morrone, Mor: I. Morel, MT: E. Meza Torres, O: E. Oehrenens, P: C. Peichoto, Ro: R. Rojas, S: Seijo, Sch: A. Schultz, Schi: A. Schinini, Se: A. Segatto, SN: V. Solís Neffa, So: M. M. Sosa, Sp: P. Speranza, St: Steibel, Tu: C. Turchetto, Z: Zeballos,

^b: Pdo.: Partido, Prov.: Provincial.

<i>Lathyrus</i>	Coleccionista ^a , Número de colección y procedencia ^b	Latitud	Longitud
Secc. Notolathyrus			
<i>L. cabrerianus</i> Burk.			
	1 S 1604. Argentina. Neuquén. Los Lagos. Lago Correntoso.	38° 06'06''S	62° 13'54''O
<i>L. crassipes</i> Hook. et Arn.			
	2 S 2340. Argentina. Corrientes. Empedrado. El Sombrero. Estación experimental INTA.	27° 33'44''S	58° 44'55''O
	3 Mor 8626. Argentina. Formosa. Pilcomayo.	25° 17'54''S	57° 45'11''O
	4 St 4468. Argentina. La Pampa. Lihuel Calel.	38° 00'52''S	65° 34'39''O
	5 S 1962. Argentina. Misiones. Candelaria. Profundidad.	27° 27'40''S	55° 38'55''O
	6 SeLeTuSNS 46. Brasil. Rio Grande do Sul. Camino desde Encruzilhada do Sul a Canguçu.	31° 33'0,5''S	52° 31'28,7''O
	7 SeLeTuSNS 71. Brasil. Rio Grande do Sul. Ruta 357. Camino a Pedra do Segredo.	30° 33'0,9''S	53° 32'13,9''O
	8 SeLeTuSNS 97. Brasil. Rio Grande do Sul. Ruta 472. Encruzilhada do Sul.	30° 32'22,3''S	52° 30'56,9''O
	9 SeLeTuSNS 84. Brasil. Rio Grande do Sul. Ruta 473. Lavras do Sul a São Gabriel.	30° 34'21''S	54° 09'15''O
	10 S 3975. Uruguay. Colonia. Ruta desde Helvecia hacia Cufre en el lado Este del paso a nivel.	34° 12'39''S	57° 07'35''O
	11 K 16288. Uruguay. San José. Sierras de Mahoma.	34° 21'17''S	56° 42'38''O
<i>L. hasslerianus</i> Burk.			
	12 S 2000. Argentina. Misiones. Depto. San Pedro. Arroyo Tambero.	26° 37'43''S	54° 07'29''O

Continuación de la Tabla 1

<i>Lathyrus</i>	Coleccionista ^a , Número de colección y procedencia ^b	Latitud	Longitud
	13 Mo 1559. Argentina. Misiones. San Pedro. Ruta prov. 16. Camino a Colonia Esmeralda.	26° 30'00''S	54° 24' 00''O
<i>L. linearifolius</i> Vog.			
	14 Ca 2685. Argentina. Corrientes. Santo Tomé. Arroyo Pariapé y Ruta 40.	28° 33'05''S	56° 02'44''O
<i>L. macropus</i> Gillies ex. Hook. et Arn.			
	15 H 9685. Argentina. Córdoba. San Javier. Sierra Grande (falda Oeste) Cuesta de las Cabras, frente a San Javier, bajando del Cerro Champaquí.	31° 28'58''S	64° 50'02''O
	16 H 9592 Argentina. Córdoba. San Javier. Sierra Grande (falda Oeste) Cuesta de las Cabras, frente a San Javier, subiendo el Cerro Champaquí, en Quebrada del Tigre.	32° 01'59''S	65° 03'00''O
	17 H 9839. Argentina. Córdoba. Minas. Sierra de Pocho: Cerro Yerba Buena, Falda Norte, cerca de la cima.	31° 03'39''S	65° 22'52''O
	18 H 17705. Argentina. Córdoba. Punilla. Sierra Chica: Cerro Uritorco, falda Oeste, frente a Capilla de Monte.	31° 25'14''S	64° 37'12,1''O
	19 H 8583. Argentina. Córdoba. Punilla. Sierra Chica falda Oeste: Cerro Uritorco, frente a Capilla del Monte.	30° 46'00''S	64° 25'01''O
	20 H 5169. Argentina. La Rioja. Capital. Sierra de Velazco: cerca de mina "El Cantadero" (=La Esperanza).	29° 24'45''S	66° 51'21''O
	21 H 5190. Argentina. La Rioja. Capital. Sierra de Velazco: cerca de mina "El Cantadero" (=La Esperanza).	29° 25'11''S	66°47'43''O
	22 S 1730. Argentina. Mendoza. Malargüe. Los Molles. Camino sobre costa N del A° Salado 5 Km antes de llegar a Los Molles.	35°1°60''S	69°54'00''O
	23 Ro 2. Argentina. San Luis.		
	24 S 1820. Argentina. San Luis. Coronel Pringles. Cerro Inti Huasi.	33° 13'52''S	65° 57'09''O
	25 Ce 1364. Argentina. San Luis. Coronel Pringles. Cañada Honda.	32° 49'59''S	66° 02'00''O
	26 H 11777. Argentina. San Luis. Junín. Sierra de Comechingones.	32° 39'53''S	64° 55'00''O
	27 H 11795. Argentina. San Luis. Junín. Sierra de Comechingones. Subiendo desde El Rincón.	32° 07'46''S	65° 34'23''O
<i>L. macrosatchys</i> Vog.			
	28 ChSSNGo 5. Argentina. Corrientes. Santo Tomé. Virasoro. Ruta Prov. 37. Rumbo a Garruchos.	28°01'53''S	55° 56'48,8''O

Continuación de la Tabla 1.

<i>Lathyrus</i>	Coleccionista ^a , Número de colección y procedencia ^b	Latitud	Longitud
	29 Schi 31317. Argentina. Formosa. Pilcomayo. Laguna Blanca.	25° 07'47''S	58° 14'41''O
<i>L. magellanicus</i> Lam. var. <i>glaucescens</i> Speg.			
	30 ChMeMaMT 23. Argentina. Chubut. Languiño.	43° 53'53,8''S	71° 25'30''O
	31 ChMeMaMT10. Argentina. Santa Cruz. Cabo San Sebastián.	53° 17'43,4''S	68° 27'35,5''O
	32 ChMeMaMT s/n. Argentina. Santa Cruz. Guer Aike. Estancia Coy Aike.	51° 36'45''S	69° 16'18''O
	33 ChMeMaMT 6. Argentina. Santa Cruz. Guer Aike. Parque Nacional Monte León.	50° 17'06,6''S	68° 57'51''O
	34 ChMeMaMT 20. Argentina. Santa Cruz. Lago Argentino. Parque Nacional Los Glaciares.	49° 14'54''S	72° 53'12''O
	35 ChMeMaMT 18. Argentina. Santa Cruz. Lago Argentino. Parque Nacional Los Glaciares. Península de Magallanes.	50° 08'00''S	73° 11'00''O
	36 ChMeMaMT 9. Argentina. Tierra del Fuego. Punta María.	53° 56'36,9''S	67° 29'40,3''O
	37 ChMeMaMT 13. Chile. Región XII. Provincia Última Esperanza. Parque Nacional Torres del Paine.	51° 04'37,9''S	72° 59'35,4''O
	38 ChMeMaMT s/n. Chile. Región XII. Parque Nacional Torres del Paine.	51° 07'15,6''S	73° 07'49,2''O
<i>L. magellanicus</i> Lam. var. <i>magellanicus</i>			
	39 S 1689. Argentina. Neuquén. Minas. Lagunas Epu Lafquen.	38° 58'28''S	68° 01'50''O
	40 S 1182. Argentina. Río Negro. Bariloche. Camino desde el Cerro Catedral al Lago Gutiérrez.	41° 11'46,4''S	71° 23'41''O
<i>L. magellanicus</i> Lam. var. <i>tucumanensis</i> Burk.			
	41 S 4004. Argentina. Jujuy. Camino a Tiraxi.	24° 11'48''S	65° 16'41''O
	42 Z 2026. Bolivia. Cochabamba. Arque a 30 km de Challa rumbo a Quillacollo.	17° 23'37''S	66° 14'47''O
<i>L. multiceps</i> Clos.			
	43 S 1195. Argentina. Neuquén. Los Lagos. Lago Villarino.	40° 28'25''S	71° 30'32''O
	44 S 1194. Argentina. Neuquén. Lacar. Hua Hum. San Martín de los Andes. Cerro Chapelco.	40° 13'56''S	71° 16'03''O
	45 S 1200. Argentina. Neuquén. Lacar. San Martín de los Andes. Cerro Chapelco.	40° 13'59''S	71° 16'00''O

Continuación de la Tabla 1.

<i>Lathyrus</i>	Coleccionista ^a , Número de colección y procedencia ^b	Latitud	Longitud
	46 S 1700. Neuquén. Minas. Lagunas de Epu-Lafquen.	38° 58'32''S	68° 02'08''O
	47 ChMeMaMT s/n. Argentina. Neuquén. Parque Nacional Lanín. Corrales del Buey.	38° 57'09''S	68° 03'48''O
	48 S 1164. Argentina. Río Negro. Bariloche. Cerro Otto.	41° 07'57''S	71° 16'59''O
<i>L. nervosus</i> Lam.			
	49 S 1206. Argentina. Buenos Aires. Pdo. Tornquist. Parque Prov. E. Tornquist. Ruta prov.76.	37° 46'18''S	61° 40'33,5''O
	50 ChMeMaMT 21. Argentina. Santa Cruz. Lago Argentino.	50° 13'16''S	71°57'57''O
	51 S 1185. Argentina. Río Negro. Bariloche.	41° 08'00''S	71° 18'37''O
	52 S 1188. Argentina. Río Negro. Los Lagos. Camino a Villa La Angostura.	40° 49'05''S	71° 36'07''O
	53 SeLeTuSNS 71. Brasil. Rio Grande do Sul. Ruta 293, desde Pelotas hacia Bagé.	31° 44'15''S	52° 47'58''O
	54 SeLeTuSNS 81. Brasil. Rio Grande do Sul. Ruta 350, camino desde Dom Feliciano hacia Encruzilhada do Sul.	30° 39'39,8''S	52° 07'27''O
	55 SeLeTuSNS 69. Brasil. Rio Grande do Sul. Ruta 357, camino a Pedra do Segredo.	30° 33'00''S	53° 31'30,2''O
	56 SSNPSO 2622. Uruguay. Maldonado, Piriápolis, Cerro San Antonio.	34°52'40''S	40°55'18''O
	57 SNSp 2158. Uruguay. Maldonado. Piriápolis. Cerro San Antonio.	34° 52'40''S	55° 18'21''O
	58 SSN 3940. Uruguay. Rivera. Bajada de Pena.		
	59 SSN 3957. Uruguay. Rivera, ruta 29. Cañada de Santa Bárbara.	31° 33'22''S	55° 30'23''O
	60 SSNPSO 2485. Uruguay. Rivera, ruta N° 30, Km 253, Bajada de Pena.	51°08'35''S	55°54'59''O
	61 SSN 3967. Uruguay. San José. Ordeig.	34° 42'18''S	56° 42'32''O
	62 SSNPSO 2658. Uruguay. San José. Barrancas del balneario Kiyú.	34°41'36''S	56°44'55''O
	63 SSN 3970. Uruguay. San José. Balneario Kiyú.	34° 41'36''S	56° 44'55''O
<i>L. nigrivalvis</i> Burk.			
	64 Sch 16.460. Argentina. Chaco. Colonia Benítez.	27° 19'59''S	58° 55'59''O
<i>L. nitens</i> Vog.			
	65 S 3966. Uruguay. Tacuarembó. Camino a Gruta de los Cuervos.	31° 37'12''S	56° 02'30''O

Continuación de la Tabla 1.

<i>Lathyrus</i>	Coleccionista ^a , Número de colección y procedencia ^b	Latitud	Longitud
<i>L. paranensis</i> Burk.	66 S 2685. Uruguay. Tacuarembó. Camino a Gruta de los Cuervos.	31°37'12''S	56° 02'30''O
	67 SSN 3957. Uruguay. Colonia. Camino desde Cufre a Guaycurú, 17 km N de Cufre.	34° 04'43''S	57° 05'09''O
	68 S 3954. Uruguay. Rivera. Ruta 29. Cañada de Santa Bárbara.		
<i>L. parodii</i> Burk.	69 K 38260. Brasil. Santa Catarina.		
<i>L. pubescens</i> Hook. et Arn.	70 S 1042. Argentina. Buenos Aires. Sierra de la Ventana.	38° 08'22''S	61° 47'38''O
	71 S 1540. Argentina. Buenos Aires. Tandil. Cerro de la piedra La Movediza.	37° 18'35''S	59° 09'55''O
	72 S 2332. Argentina. Buenos Aires. Pdo. Tornquist. Parque Provincial E. Tornquist.	38° 05'29''S	62° 16'13''O
	73 Sch 606. Argentina. Catamarca.	28° 28'07''S	65° 46'44''O
	74 Ro s/n . Argentina. Córdoba. Punilla. Sierra Grande.	31° 23'57''S	64° 10'59''O
	75 C 2922. Argentina. Entre Ríos. Colón. Parque Nacional El Palmar.	32° 13'30''S	58° 08'44''O
	76 Bo 4008. Argentina. Formosa. Pirané.	25° 43' 55,3''S	59° 06' 24''O
	77 Sch 907. Argentina. Salta. Victoria.	22° 16'17''S	62° 42'35''O
	78 SSN 4005. Argentina. Tucumán. Cerro San Javier.	26° 47'57,9''S	65° 21'24,9''O
	79 SSN 4006. Argentina. Tucumán. Cerro San Javier y Villa Noguéz.	26° 48'47,4''S	65° 22'05,4''O
	80 SSN 3082. Bolivia. Santa Cruz. Caballero.	17° 52'46''S	64° 36'24''O
	81 SeLeTuSNS 87. Brasil. Rio Grande do Sul Camino desde Bagé hacia Caçapava do Sul.	39° 52'22,8S''	53° 38'45,2''O
	82 SeLeTuSNS 81. Brasil. Rio Grande do Sul Caminos desde Lavras do Sul hacia São Gabriel.	30° 44'30''S	53° 55'22,8''O
	83 SeLeTuSNS 55. Brasil. Rio Grande do Sul. Ruta 293 desde Pinhero Machado hacia Bagé.	31° 33'31,3''S	53° 24'13,7''O
	84 SeLeTuSNS 70. Brasil. Rio Grande do Sul. Ruta 350 camino desde Chuvisca hacia Dom Feliciano.	30° 41'49,2''S	52° 04'13''O

Continuación de la Tabla 1.

<i>Lathyrus</i>	Coleccionista ^a , Número de colección y procedencia ^b	Latitud	Longitud
	85 SeLeTuSNS 79. Brasil. Rio Grande do Sul. Ruta 357, Lavras do Sul.	30° 47'57,9''S	53° 53'42,5''O
	86 SeLeTuSNS 45. Brasil. Rio Grande do Sul. Ruta 471 desde Encrucilhada do Sul hacia Canguçu, pasando el río Canguçu.	31° 08'47,1''S	52° 49'33''O
	87 SSN 3954. Uruguay. Rivera. Ruta 29. Cañada de Santa Bárbara.	30° 53'45''S	57° 37'28''O
	88 SSN 3969. Uruguay. San José. Ordeig.	34° 42'18''S	56° 42'36''O
	89 SSN 3927. Uruguay. Paysandú. Ruta 3. Puente sobre Arroyo Guaviyú.	30° 38'04''S	57° 41'15''O
	90 SSN 3941. Uruguay. Rivera. Bajada de Pena.	31° 08'35''S	55° 54'59''O
	91 SSN 3959. Uruguay. Rocha. Bañado de Rocha.	31° 36'06''S	55° 49'25''O
	92 SSN 3972. Uruguay. San José. Balneario Kiyú.	31° 41'36''S	56° 44'55''O
	93 SSN 2363. Uruguay. San José. Sierras de Mahoma.	34° 04'44''S	56° 53'36''O
	94 G 451 Perú. Cajamarca. Porción Bajo 15 Km.	07° 09'44''S	78° 30'38''O
<i>L. subandinus</i> Phil.			
	95 O 45396. Chile. Región VIII. Ñuble. Camino a termas de Chillán más arriba de las trancas.	36° 36'52''S	72° 04'23''O
<i>L. subulatus</i> Lam.			
	96 Ku 20. Argentina. Corrientes. Curuzú Cuatiá. 16,1 km SW del Rio Mocoreta. Ruta 127. Entrada de la Estancia San José de Portillo.	29° 47'55''S	58° 00'53''O
	97 SSN 2907. Argentina. Buenos Aires. Coronel Suárez. Estancia El Pantanoso.	37° 27'18''S	61° 53'31''O
	98 SeLeTuSNS 92. Brasil. Rio Grande do Sul. Ruta 153, camino desde Bagé a Caçapava do Sul.	31° 10'04,3''S	53° 49'23,9''O
	99 SeLeTuSNS 97. Brasil. Rio Grande do Sul. Ruta 293, desde Pinhero Machado a Bagé.	31° 26'48''S	53° 49'23,9''O
	100 SSN 3938. Uruguay. Artigas. Ruta 30. Puente sobre Arroyo Catalán Grande.	30° 50'31''S	56° 14'20''O
	101 SN 2178. Uruguay. Rocha. Ruta 13, km 264.	34° 03'1''S	53° 54'57''O
	102 SSN 3926. Uruguay. Salto. Ruta 3.	31° 24'48''S	57° 56'33''O
	103 SSN 3962. Uruguay. Tacuarembó. Camino a Gruta de los Cuervos.	31° 37'26''S	56° 02'20''O
<i>L. tomentosus</i> Lam.			
	104 S 1207. Argentina. Buenos Aires. Pdo. Tornquist. Parque Prov. E. Tornquist.	30° 06'16''S	62° 13'35''O

Continuación de la Tabla 1.

<i>Lathyrus</i>	Coleccionista ^a , Número de colección y procedencia ^b	Latitud	Longitud
<i>L. tropicalandinus</i> Burk.	105 H 20887. Catamarca. Sierra de Ambato.	28° 35'S	66° 07'O
Secc. Lathyrus			
<i>L. odoratus</i> L.	S 2008. Cultivado en Corrientes. Origen Japón.		
<i>L. latifolius</i> L.	S 1738. Argentina. Mendoza. San Rafael.		
<i>L. sylvestris</i> L.	S s/n. Cultivado en Corrientes. Origen: Matsuyama, Japón.		
Secc. Orobus			
<i>L. japonicus</i> Willd.	S 2353. Japón. Shikoku. Ehime. Matsuyama. Kashima.		

CAPÍTULO II

CARACTERIZACIÓN

CROMOSÓMICA DE ESPECIES

SUDAMERICANAS DE *Lathyrus*

INTRODUCCIÓN

El estudio de la variación del número y la morfología de los cromosomas ha sido una fuente importante de información para el entendimiento de la evolución de muchos grupos de plantas (Stebbins 1971). El análisis del cariotipo, en cuanto a sus características estructurales y cuantitativas, resulta importante en investigaciones taxonómicas y evolutivas debido a que los complementos cromosómicos no son sistemas estáticos, sino que se encuentran en constante cambio como resultado del proceso de evolución. Estos cambios se expresan en características tales como el número, la forma y el tamaño de los cromosomas (Naranjo y Poggio 2004).

Desde el punto de vista citológico, los primeros recuentos cromosómicos para el género *Lathyrus* fueron realizados por Winge (1919) en las especies *L. latifolius* y *L. odoratus*. Desde entonces, diferentes autores dieron a conocer los números cromosómicos de distintas especies, principalmente de las del Hemisferio Norte. Los aportes más significativos los hicieron Melderis y Viksne (1931), Simonet (1932) y Senn (1938), quienes publicaron los números cromosómicos de 9, 23 y 32 especies, respectivamente. Estos estudios demostraron que la mayoría de las especies del género son diploides, con un número básico $x = 7$ (Goldblatt 1981) y con muy baja incidencia de poliploidía.

Los análisis cariotípicos realizados en un grupo pequeño de especies mostraron que existe variabilidad en el tamaño cromosómico, pero escasa variación en la morfología de los cromosomas y en los patrones de las regiones organizadoras del nucléolo (NORs) (Murray *et al.* 1992, Ali *et al.* 2000, Seijo y Fernández 2003). La variación en la morfología cromosómica permitió la identificación de grupos de especies asociados principalmente a los ciclos de vida y, de manera menos precisa, a las secciones taxonómicas a las que pertenecen (Yamamoto *et al.* 1984, Seijo y Fernández 2003). Sin

embargo, la variación en las características cromosómicas por técnicas de tinción convencional no fue suficiente para caracterizar a la mayoría de los taxones a nivel específico.

Las especies sudamericanas de *Lathyrus* han sido incluidas en una sola sección, teniendo en cuenta únicamente un criterio geográfico ya que no poseen ningún carácter diagnóstico común. Sin embargo, individualmente, comparten varias características morfológicas con especies pertenecientes a diferentes secciones del género (Kupicha 1983). La presencia de varios caracteres plesiomórficos y la falta de sinapomorfías que definan a la sección *Notolathyrus*, han obstaculizado hasta ahora el conocimiento del origen de las especies sudamericanas y la comprensión de su relación con los otros miembros del género.

Los estudios citogenéticos realizados en la sección *Notolathyrus*, hasta el momento, revelaron que todas las especies son diploides (Krapovickas y Fuchs 1957, Battistin y Fernández 1994, Klamt y Schifino-Wittman 2000, Seijo y Fernández 2003). Los análisis cariotípicos realizados en este grupo evidenciaron que las especies presentan fórmulas cariotípicas similares (Battistin y Fernández 1994, Klamt y Schifino-Wittmann 2000, Seijo y Fernández 2003), aunque muestran variaciones significativas en las longitudes de sus cariotipos.

En los grupos de especies con cariotipos semejantes, como *Lathyrus*, el análisis de los patrones de heterocromatina junto con el mapeo físico de secuencias de ADN por hibridación *in situ* fluorescente (FISH) han proporcionado marcadores útiles para la delimitación de especies (Raina *et al.* 2001, Robledo *et al.* 2009), para establecer relaciones entre los taxones dentro de los grupos (Thomas *et al.* 1997, Robledo y Seijo 2010) y para inferir los mecanismos de evolución cariotípica (Moscone *et al.* 2007, Wolny y Hasterok 2009). Hasta el momento, la detección de heterocromatina por bandeo C en *Lathyrus* fue realizada en algunas especies del viejo mundo (Lavania y Sharma 1980, Narayan 1982, Narayan y McIntre 1989) y focalizada principalmente en la investigación de las causas y consecuencias de la variación del tamaño genómico dentro del género. El bandeo fluorescente fue también aplicado a un pequeño grupo de especies, en su mayoría coincidentes con las analizadas en los ensayos de bandeo C (Ünal *et al.* 1995, Ali *et al.* 2000). Tanto el bandeo fluorescente como el bandeo C proveyeron un conjunto de nuevos marcadores cromosómicos útiles para proponer hipótesis de evolución cariotípica en *Lathyrus*.

La localización de los genes ribosomales 18S-26S y 5S mediante FISH ha sido aplicada a ocho especies de *Lathyrus* pertenecientes al viejo mundo: *L. odoratus* (Murray *et al.* 1992), *L. annuus* L., *L. cicera*, *L. sativus* y *L. tingitanus* pertenecientes a la sección *Lathyrus*; *L. aphaca* L., sección *Aphaca*; *L. clymenum* L., y *L. ochrus*, sección *Clymenum* (Ali *et al.* 2000). A pesar de esta pequeña muestra, el número y la distribución de los *loci* ribosomales mostraron variación interespecífica lo cual generó marcadores útiles para la delimitación de especies.

En este contexto, la aplicación de las técnicas de bandeo cromosómico y la hibridación *in situ* fluorescente en especies de la sección *Notolathyrus* podría contribuir a la caracterización citogenética de los taxones y proporcionar información para comprender el mecanismo de diversificación cromosómica ocurrido dentro del grupo.

Uno de los resultados más sorprendentes de los análisis citológicos de las especies de *Lathyrus* es que, a pesar del número constante de cromosomas y de la marcada similitud en cuanto a la morfología de los cariotipos, la longitud de los complementos varía en gran medida (Yamamoto *et al.* 1984, Seijo y Fernández 2003). En concordancia, se ha observado que el tamaño genómico (valor 2C de ADN) de las especies del Hemisferio Norte varía hasta cuatro veces (Rees y Hazarika 1969, Narayan 1982).

Los análisis de las distintas fracciones del ADN genómico han demostrado que los cambios cuantitativos de ADN repetitivo constituyen la principal causa de los cambios en el tamaño genómico (Lavania y Sharma 1980, Ceccarelli *et al.* 2010). A nivel citológico, estas variaciones han sido correlacionadas con las variaciones en la fracción heterocromática, como también, en la fracción eucromática de los cromosomas (Narayan y Rees 1976, Rees y Narayan 1977, Narayan 1982). En lo que concierne a las especies de la sección *Notolathyrus*, aunque se ha demostrado que presentan variaciones en las longitudes de sus complementos (Klamt y Schifino-Wittman 2000, Seijo y Fernández 2003), no hay datos acerca del tamaño genómico ni acerca del rol de la variación del contenido de ADN en la evolución cromosómica dentro del grupo.

En este Capítulo se mapean los *loci* ADNr 18-26S y 5S mediante FISH y las bandas heterocromáticas mediante la utilización de fluorocromos CMA⁺ y DAPI⁺ en 11 especies de *Lathyrus* de América del Sur y en 4 especies de *Lathyrus* del Hemisferio Norte. Adicionalmente, se determinó el contenido 2C de ADN en 12 especies sudamericanas y en algunas especies de otras secciones.

Objetivo general

Caracterizar cariotípicamente a las especies de *Notolathyrus* e investigar los patrones de evolución cariotípica mediante el análisis comparativo y detallado de distintos marcadores cromosómicos y del contenido de ADN genómico de estos taxones.

Objetivos específicos

- 1- Analizar la bondad de los marcadores cromosómicos en la delimitación de las especies de *Notolathyrus*.
- 2- Investigar el rol de la variación en el contenido de ADN.
- 3- Investigar la existencia de algún marcador diagnóstico para la sección.
- 4- Analizar los patrones de los cambios cromosómicos durante la diversificación de las especies sudamericanas.

Hipótesis

- 1- Los patrones de variación de heterocromatina y de genes ribosomales permiten identificar a las especies de *Notolathyrus*.
- 2- Las variaciones en las longitudes cariotípicas observadas en la sección *Notolathyrus* están determinadas por cambios proporcionales en el contenido de ADN.
- 3- Las especies de *Notolathyrus* se diferencian cariotípicamente de las especies de otras secciones.
- 4- Los patrones de variación de heterocromatina, de genes ribosomales y de contenido de ADN han tenido un rol preponderante en la diversificación de las especies de Sudamérica.

MATERIALES Y MÉTODOS

El análisis cariotípico se realizó en 11 especies pertenecientes a la sección *Notolathyrus* [47, 82 % de los taxones reconocidos para la sección (Kupicha 1983)] y en cuatro especies de las secciones *Lathyrus* y *Orobus* (Tabla 2). El análisis del contenido de ADN se realizó en 12 especies sudamericanas (52,27 %) que incluyeron las 11 especies utilizadas para el análisis cariotípico y *L. subulatus*; y en cuatro especies provenientes del Hemisferio Norte (Tabla 2). Los valores del contenido de ADN para *L. sylvestris* y *L. odoratus* fueron tomados de [http:// www.kew.org](http://www.kew.org).

Tabla 2. Lista de las muestras de las especies de *Lathyrus* analizadas pertenecientes a las secciones *Notolathyrus*, *Lathyrus* y *Orobus*. Los coleccionistas, el número de colección y la procedencia de cada una de las muestras se describen en la Tabla 1.

Especie	Código	Ciclo de vida
Notolathyrus		
<i>L. cabrerianus</i>	1	P
<i>L. crassipes</i>	2	A
<i>L. hasslerianus</i>	12	P
<i>L. macropus</i>	22	P
<i>L. macrostachys</i>	28	P
<i>L. magellanicus</i> var. <i>magellanicus</i>	40	P
<i>L. multiceps</i>	43	P
<i>L. nervosus</i>	52	P
<i>L. nitens</i>	66	P
<i>L. paranensis</i>	68	P
<i>L. pubescens</i>	72	P
<i>L. subulatus</i>	103	P
<i>L. tomentosus</i>	104	P
Lathyrus		
<i>L. odoratus</i>	-	A
<i>L. latifolius</i>	-	P
<i>L. sylvestris</i>	-	P
Orobus		
<i>L. japonicus</i>	-	P

Análisis cariotípicos

Obtención de los preparados cromosómicos

Los preparados mitóticos se realizaron a partir de ápices radicales de semillas germinadas. Para acelerar su germinación, las semillas fueron escarificadas con ácido sulfúrico concentrado. El tiempo de tratamiento fue variable para cada especie y sujeto al tamaño de la semilla y al grosor de la testa. Posteriormente, las semillas fueron lavadas en agua corriente y transferidas a cajas de petri, acondicionadas con papel de filtro y algodón humedecido con una solución fungicida (Captán). Las mismas fueron mantenidas a 5 °C hasta su germinación (generalmente entre 20 y 25 días).

El pretratamiento de las raíces se realizó, en principio, con frío durante 24 h. Sin embargo, como no se obtuvo un grado de acortamiento suficiente, los cromosomas largos tendían a superponerse en las metafases dificultando las mediciones. A raíz de esto, se probaron pretratamientos con distintos agentes químicos: colchicina 0,5 % por 3 a 4 h, α -bromonaftaleno por 4 a 5 h, paradiclorobenceno por 3 a 4 h y con 8-hidroxiquinoleína 2 mM por 4 a 5 h. De todos estos ensayos, el último fue el que arrojó los mejores resultados, utilizando un tiempo de 4 h de incubación. Luego del pretratamiento, las raíces fueron fijadas en una solución de etanol absoluto-ácido acético glacial (3:1) y mantenidas en la misma a -20° C hasta su utilización.

Para la confección de los preparados, los meristemas radicales fueron digeridos con una mezcla de celulasa de *Trichoderma viridae* (Onozuka, Japón) 1 % y pectinasa de *Aspergillus niger* (Sigma, USA) 10 % disuelta en glicerol 40 % en tampón citrato 0,01 M (pH 4,8) a 37 °C durante 20 a 45 min aproximadamente, dependiendo de la especie en cuestión. El tiempo de digestión se ajustó según el tamaño de la raíz y el tiempo de conservación de la misma. Seguidamente, los meristemas fueron lavados con agua destilada y disgregados mecánicamente en ácido acético 45 %. Los cubreobjetos fueron removidos con CO₂ (Bowen 1956) y los preparados fueron secados en estufa a 37 °C.

Bandeo cromosómico fluorescente

La detección y caracterización de la heterocromatina se realizó utilizando la técnica de doble tinción con cromomicina A₃ (CMA, Serva) y 4'-6-diamidino-2-fenil-indol (DAPI, Sigma) según Schweizer (1980), con modificaciones en el tiempo y en las condiciones de montaje del cubreobjetos, previamente a los experimentos de FISH.

Los preparados se incubaron con CMA (0,5 mg en 1 ml de tampón Mc Ilvaine 50 % v/v pH 7, $MgCl_2$ 5 mM) en cámara húmeda y oscura a temperatura ambiente durante 60 min. Se lavaron con agua destilada y luego se incubaron con DAPI (2 $\mu g/ml$ en tampón Mc Ilvaine pH 7) durante 30 a 45 min en las mismas condiciones. Después de la incubación con cada fluorocromo, los preparados fueron lavados con agua destilada y, finalmente, se montaron en *Vectashield*. Luego fueron madurados en cámara oscura a 4 °C durante 3 a 5 días para su posterior observación.

Por último, los preparados utilizados para bandeos fueron decolorados por medio de dos lavados consecutivos en alcohol 96 % y alcohol absoluto durante 24 h a 4 °C cada uno, con el objetivo de utilizarlos en los experimentos de FISH.

Hibridación *in situ* fluorescente

Para localizar los *loci* 45S y 5S ADNr se utilizaron las siguientes secuencias aisladas de *Arachis hypogaea* subsp. *fastigiata* (Robledo y Seijo 2008):

-pA18S y pA25S (fragmentos de 1573 y 3296 pb, respectivamente) correspondientes a las secuencias de ADNr 18S y 25S.

-pA5S (fragmento de ~400 pb) que incluye a una unidad repetida del gen 5S ARNr y el espaciador intergénico adyacente.

Ambas secuencias fueron obtenidas y cedidas por el Dr. Germán Robledo del IBONE, Corrientes.

Las secuencias fueron marcadas con digoxigenina-11-dUTP (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany) o con biotina-11-dUTP (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) mediante la técnica de *nick translation* (Amersham) de acuerdo a las condiciones recomendadas por el proveedor.

La eficiencia de marcado de las sondas fue evaluada mediante detección inmunológica y comparación colorimétrica en ensayos de *dot blot*. Para este análisis, se realizaron diluciones seriadas 1/20 en agua destilada, y se sembró 1 μl de cada una de estas diluciones sobre una membrana de nitrocelulosa (Amersham HybondTM-N+, Amersham). La membrana fue incubada a 80 °C durante 2 h, luego humedecida con agua desionizada durante 5 min y equilibrada en solución 1 (Tris-HCl 0,1 M pH 7,5, NaCl 0,1 M) durante 2 min. Posteriormente, fue bloqueada con solución 2 (Tris-HCl 0,1 M pH 7,5, NaCl 0,1 M, BSA 3 %) durante 20 min e incubada en solución de 0,15 U/ml de estreptavidina conjugada con fosfatasa alcalina (Roche) y de 0,75 U/ml anticuerpo anti-digoxigenina conjugada a fosfatasa alcalina (Roche) en Tris-HCl 0,1 M pH 7,5, NaCl 0,1 M durante

otros 10 min. Para el revelado, la membrana fue expuesta a dos lavados sucesivos durante 10 min en solución 1 y un lavado en solución 3 (0,1 M Tris pH 9,5, 01 M NaCl, 50 mM MgCl₂) e incubada en oscuridad en solución sustrato BCIP/NBT (Sigma) hasta el desarrollo de la reacción colorimétrica. La eficiencia del marcado se estimó comparando las intensidades de color de los puntos correspondientes a las diluciones de cada sonda con respecto a un ADN marcado control.

Hibridación *in situ* fluorescente de los preparados cromosómicos

La localización cromosómica de las secuencias de ADNr por FISH se realizó siguiendo la técnica de hibridación *in situ* doble, según Moscone *et al.* (1996) y Seijo *et al.* (2004).

Las mezclas de hibridación con 100 µl de volumen final consistieron en 1,5 a 3 ng de cada una de las sondas, 60 µl de formamida desionizada, 10 µl de sulfato de dextrano 50 % P/v y 100 µg de esperma de salmón sonicado, en SSC 2×. La combinación de sondas utilizada fue pA5S + pA18S-pA26S. Los preparados fueron incubados en una solución de ARNasa 0,1 mg/ml en SSC 2× durante 1h a 37 °C y lavados tres veces en una solución de SSC 2×. Seguidamente, fueron equilibrados en solución tampón Tris-HCl 20 mM pH 7,5, Cl₂Ca 2 mM, durante 5 min a 37 °C y, subsecuentemente, incubados en una solución de proteinasa K (proteínasa K 0,01 U/ml - USB-, Tris-HCl 20 mM pH 7,5, Cl₂Ca 2 mM) durante 10 min a 37 °C. Luego, los preparados fueron lavados por inmersión en una solución de Cl₂Mg 50 mM en PBS 1× y fijados en una solución de paraformaldehído 1 % P/v en PBS 1×. Por último, los preparados fueron lavados en PBS 1× por 5 min y deshidratados en una serie alcohólica (70 %, 95 % y 100 %).

Previo al agregado de la mezcla de hibridación, los preparados fueron secados en plancha térmica a 80 °C durante 10 min y luego enfriados a temperatura ambiente. Paralelamente, la mezcla de hibridación fue desnaturalizada a 75 °C durante 10 min e inmediatamente enfriada en baño de agua-hielo. Se agregaron 5 µl de la mezcla de hibridación sobre cada preparado, se cubrieron con cubreobjetos y se sellaron. Se realizó una desnaturalización conjunta (cromosomas de las preparaciones + mezcla de hibridación aplicada) calentando los preparados montados en plancha térmica a 74 °C durante 10 min. Posteriormente, los preparados fueron incubados a 37 °C durante 12 h en cámara húmeda.

Luego de la hibridación, los cubreobjetos de las preparaciones cromosómicas fueron removidos en una solución de SSC 2×. Posteriormente, los preparados fueron transferidos a una solución de formamida 60 % v/v en SSC 2× e incubadas a 37 °C durante 15 min y

lavadas en SSC 2× a 37 °C durante 15 min. Las preparaciones se escurrieron y se agregaron 50 µl de una solución bloqueante de BSA 3 % P/v en PBS 1×. Se cubrieron con un cubreobjetos de parafilm® y se incubaron durante 1 h a 37 °C en cámara húmeda. Se escurrió la solución bloqueante y se adicionaron 15 µl de la solución correspondiente a la primera serie de anticuerpos (anticuerpo anti-digoxigenina conjugado con FICT producido en ratón -Sigma-Aldrich- 75 ng/µl, anticuerpo anti-biotina producido en cabra -Sigma-Aldrich- 30 ng/µl, en PBS 1×, BSA 3% P/v). Posteriormente, los preparados se cubrieron con cubreobjetos de parafilm® y se incubaron a 37 °C durante 1 h en cámara húmeda. Una vez transcurrido este tiempo, se removieron los cubreobjetos de parafilm® y los preparados se lavaron tres veces en solución de BSA 0,1 % P/v en PBS 1× durante 5 min por vez. Seguidamente, se escurrió la solución de lavado y se agregaron 15 µl de la solución correspondiente a la segunda serie de anticuerpos [fragmento Fab' 2 anti-IgG de ratón, producido en conejo, conjugado a isotiocianato de fluoresceína (FICT) -Sigma-Aldrich- 33 ng/µl, anticuerpo anticabra, producido en conejo y conjugado a tetrametilrodamina isocianato (TRICT) -Sigma-Aldrich- 239 ng/µl, en PBS 1×, BSA 3% P/v]. Los preparados fueron cubiertos con cubreobjetos de parafilm® y se incubaron a 37 °C durante 1 h en cámara húmeda. Se repitió la serie de lavados y posteriormente los preparados se fijaron en una solución de paraformaldehído 4 % P/v en PBS 1× durante 5 min. Las preparaciones se lavaron con agua destilada, se deshidrataron en una serie alcohólica (70 %, 95 % y 100 %) y se dejaron secar al aire. Finalmente, las preparaciones se montaron con 5 µl de una solución DAPI 2 µg/ml en *Vectashield* (Vector).

Adquisición de imágenes digitales

Las preparaciones cromosómicas fueron analizadas y fotografiadas usando un microscopio de epifluorescencia Leica DMRX (Leica, Heerbrugg, Suiza), equipado con un sistema de cámara digital Leica DC 350 asistida por computadora.

Las imágenes en los canales azul, rojo y verde fueron capturadas en blanco y negro usando los filtros apropiados. Posteriormente, las mismas fueron importadas al programa Photoshop, versión 7.0 (Adobe, San Jose, California, EE.UU.) donde fueron pseudo-coloreadas, combinadas y procesadas usando las funciones de brillo y contraste.

Confección de los idiogramas

Los idiogramas se realizaron utilizando los promedios obtenidos a partir de la medición de las imágenes digitales de 10 placas metafásicas de preparados pretratados para

FISH, utilizando el programa MicroMeasure 3.3 (Reeves 2001). Los cromosomas fueron ordenados de acuerdo a su morfología y, dentro de cada grupo, por tamaño decreciente.

La descripción cariotípica se realizó empleando la nomenclatura propuesta por Levan *et al.* (1964). De acuerdo al índice centromérico ($ic = \text{brazo corto} \times 100 / \text{largo total}$) los cromosomas se clasificaron en tres categorías: metacéntricos (*m*) cuando los valores se encuentran comprendidos entre 50 y 37,5, submetacéntricos (*sm*) entre 37,5 y 25 y subtlocéntricos (*st*) entre 25 y 12,5. La longitud cromosómica media (LC) se determinó promediando la longitud de los cromosomas homólogos de cada par, y la longitud total del complemento (LTCH) fue determinada promediando las longitudes de todos los pares de cromosomas analizados.

La estimación de la asimetría de los cariotipos fue realizada mediante los índices de asimetría A_1 y A_2 , de acuerdo al método propuesto por Romero Zarco (1986).

La posición de los sitios ADNr 45S y 5S y de las bandas heterocromáticas fueron clasificadas en proximales, intersticiales y distales, según la proximidad al centrómero utilizando el índice d_i calculado como: $d_i = d \times 100/a$, donde d = distancia del centro de la banda al centrómero y a = largo del brazo cromosómico correspondiente (Greilhuber y Speta 1976).

Medición del contenido de ADN

El contenido de ADN se determinó por citometría de flujo (Doležel *et al.* 1992), en un equipo Partec PA II (Partec GmbH, Münster, Alemania) empleando yoduro de propidio (PI). Debido a las diferencias de tamaño genómico halladas entre las especies de *Lathyrus* estudiadas, se utilizaron dos especies como patrones para las mediciones: *Pisum sativum* var. L' Ctirad ($2C = 9,09$ pg) y *Secale cereale* var. L' Daňouské ($2C = 18$ pg) (Doležel *et al.* 2007), cedidas gentilmente por el Dr. Doležel (Institute of Experimental Botany AS CR).

Para la extracción de los núcleos se emplearon hojas frescas, hojas secadas en sílica gel o bien hojas frescas conservadas a -80 °C. Las muestras (1 cm^2) fueron picadas en 0,5 ml de tampón OTTO I dentro de una caja de Petri plástica. Luego de 3 a 5 min de incubación en este tampón, la suspensión fue filtrada con una malla de nylon de 30 μm . Al filtrado se le adicionaron 2 ml de tampón de tinción OTTO II con PI (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$). Todas las muestras fueron analizadas con UV a 355 nm. Para cada muestra se midieron 5000 núcleos y las determinaciones se hicieron por triplicado. El análisis de los datos fue realizado empleando el software PA II's Partec FloMax.

El valor absoluto del contenido de ADN de cada una de las muestras fue calculado siguiendo la fórmula empleada por Doležel y Bartos (2005):

$$\text{Contenido de ADN de la muestra} = \frac{\bar{X} \text{ del pico G1 de la muestra}}{\bar{X} \text{ del pico G1 del patrón}} \times \text{contenido de ADN (2C) del patrón (pg)}$$

Análisis estadísticos

Para evaluar el grado de variación y la significancia estadística de los parámetros cariotípicos de las especies o poblaciones analizadas, los mismos fueron comparados con ANOVA, aplicándose posteriormente el test de Tukey. El nivel de significancia utilizado para todos los test fue $\alpha = 0,05$. Asimismo, se llevó a cabo un análisis de correlación de Pearson entre las variables: 1) contenido de ADN y cantidad de heterocromatina, 2) contenido de ADN y longitud de la eucromatina y 3) contenido de ADN y largo total del complemento haploide. Todos los análisis fueron realizados con el programa Infostat versión 2009 (InfoStat 2009).

RESULTADOS

Las fórmulas cariotípicas y las características generales de los cariotipos se resumen en las Tablas 3 y 4, la distribución y el número de las bandas heterocromáticas y de los *loci* 45S y 5S ADNr mapeados para las especies de *Lathyrus* analizadas se presentan en la Tabla 5, mientras que el contenido de ADN para las mismas se muestra en la Tabla 6. Las metafases somáticas representativas de las especies estudiadas mediante bandeo CMA/DAPI se muestran en las Figuras 6-8 y después del tratamiento de FISH en las Figuras 9 y 10. Los idiogramas consenso se ilustran en las Figuras 11 y 12.

Números cromosómicos y análisis cariotípicos

Todas las especies estudiadas en este Capítulo fueron diploides con $2n = 2x = 14$ (Figs. 6-10). Se identificaron cinco fórmulas cariotípicas distintas en las 15 especies analizadas (Tabla 3). Las fórmulas cariotípicas establecidas fueron variables entre las especies pertenecientes a una misma sección. Asimismo, se encontraron características particulares para las especies que pertenecen a las distintas secciones (Tabla 3, Figs. 11-12). Los cariotipos de las especies de *Notolathyrus* se caracterizaron por la presencia de un par cromosómico subtelocéntrico, una gran proporción de cromosomas submetacéntricos y por ninguno o muy pocos (hasta a dos pares) cromosomas metacéntricos. Sin embargo, las especies analizadas de las secciones del Hemisferio Norte presentaron cariotipos compuestos sólo por cromosomas metacéntricos (de tres a cuatro pares) y submetacéntricos.

El promedio de las longitudes cromosómicas de cada una de las especies analizadas varió de 5,71 a 13,77 μm y el promedio de las longitudes total del complemento haploide varió de 42,20 (*L. japonicus*) a 76,71 μm (*L. latifolius*). En *Notolathyrus* la longitud total del complemento haploide varió de 49,97 (*L. crassipes*) a 65,77 μm (*L. macrostachys*). Dentro de cada sección, las especies anuales presentaron un complemento cromosómico más corto que las especies perennes (Tabla 4).

El promedio de los índices centroméricos de las especies de la sección *Notolathyrus* fue menor que el de las especies de otras secciones (Tabla 4). En general, el índice de asimetría A_1 reveló un grado moderado de asimetría intracromosómica en las especies de *Notolathyrus* y mayor que el observado en las especies de otras secciones. El índice de asimetría A_2 fue relativamente pequeño y similar en todas las especies estudiadas (Tabla 4). En el diagrama de dispersión de los índices de asimetría A_1 y A_2 (Fig. 13) se observó

que las especies formaron tres grupos, cada uno de ellos correspondiente a una sección. Las especies de la sección *Notolathyrus* presentaron los cariotipos más asimétricos.

Tabla 3. Fórmulas cariotípicas de las especies de *Lathyrus* analizadas.

<i>Lathyrus</i>	Fórmula cariotípica
Secc. Notolathyrus	
<i>L. cabrerianus</i>	12 sm + 2 st
<i>L. crassipes</i>	4 m + 8 sm + 2 st
<i>L. hasslerianus</i>	2 m + 10 sm + 2 st
<i>L. macrostachys</i>	12 sm + 2 st
<i>L. magellanicus</i> var. <i>magellanicus</i>	2 m + 10 sm + 2 st
<i>L. multiceps</i>	12 sm + 2 st
<i>L. nervosus</i>	12 sm + 2 st
<i>L. nitens</i>	2 m + 10 sm + 2 st
<i>L. paranensis</i>	12 sm + 2 st
<i>L. pubescens</i>	12 sm + 2 st
<i>L. tomentosus</i>	12 sm + 2 st
Secc. Lathyrus	
<i>L. latifolius</i>	6 m + 8 sm
<i>L. odoratus</i>	6 m + 8 sm
<i>L. sylvestris</i>	8 m + 6 sm
Secc. Orobus	
<i>L. japonicus</i>	8 m + 6 sm

Tabla 4. Resumen de las características cromosómicas de las especies de *Lathyrus*. **LTCH**= longitud total del complemento haploide, **S**= desvío estándar, **LC**= longitud media cromosómica, **IC**= índice centromérico, **A₁**= índice de asimetría intracromosómica, **A₂**= índice de asimetría intercromosómica. Los valores de LTCH y LC se expresan en μm . Los asteriscos distinguen a las especies anuales. Las letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas en los valores promedios de LTCH ($p < 0,05$) obtenidos por el test de Tukey.

<i>Lathyrus</i>	LTCH \pm S	LC \pm S	Rango	IC	A ₁	A ₂
Secc. Notolathyrus						
<i>L. cabrerianus</i>	52,54 \pm 0,37 ^b	7,50 \pm 0,26	6,22 - 8,09	29,73	0,56	0,09
<i>L. crassipes</i> *	49,97 \pm 3,55 ^a	7,30 \pm 0,51	6,17 - 8,14	33,62	0,48	0,09
<i>L. hasslerianus</i>	61,07 \pm 0,52 ^{c,d,e,f}	8,72 \pm 0,07	7,87 - 10,48	31,93	0,52	0,11
<i>L. macrostachys</i>	65,77 \pm 3,51 ^f	9,40 \pm 0,43	10,77 - 7,82	31,67	0,53	0,12
<i>L. magellanicus</i> var. <i>magellanicus</i>	64,35 \pm 2,59 ^{e,f}	9,19 \pm 0,41	8,06 - 10,59	31,59	0,53	0,09
<i>L. multiceps</i>	51,03 \pm 4,83 ^{b,c,d,e}	7,29 \pm 0,67	6,12 - 8,86	31,17	0,54	0,12
<i>L. nervosus</i>	58,32 \pm 5,00 ^{b,c}	8,33 \pm 0,79	7,80 - 9,47	31,57	0,44	0,09
<i>L. nitens</i>	62,15 \pm 3,36 ^{c,d,e,f}	8,88 \pm 0,47	7,69 - 10,10	31,45	0,53	0,09
<i>L. paranensis</i>	54,93 \pm 1,88 ^{b,c,d,e,f}	7,85 \pm 0,28	6,77 - 8,87	32,86	0,53	0,08
<i>L. pubescens</i>	62,95 \pm 0,41 ^{c,d,f}	8,99 \pm 0,41	6,74 - 10,73	33,53	0,47	0,15
<i>L. tomentosus</i>	58,41 \pm 0,43 ^{b,c,d,e,f}	8,34 \pm 0,20	6,44 - 10,01	30,51	0,56	0,15
Secc. Lathyrus						
<i>L. latifolius</i>	76,71 \pm 3,59 ^g	10,96 \pm 0,89	9,73 - 13,77	37,45	0,39	0,13
<i>L. odoratus</i> *	49,83 \pm 1,92 ^{a,b}	7,12 \pm 0,58	5,71 - 8,90	37,90	0,39	0,14
<i>L. sylvestris</i>	62,72 \pm 5,70 ^{d,e,f}	8,96 \pm 0,67	7,67 - 10,73	41,12	0,32	0,11

Continuación de la Tabla 4.

<i>Lathyrus</i>	LTC \pm S	LC \pm S	Rango	IC	A ₁	A ₂
Secc. Orobus						
<i>L. japonicus</i>	42,20 \pm 1,68 ^a	6,03 \pm 0,24	4,58 - 8,16	39,96	0,35	0,19
ANOVA	F= 17,45 p=<0,0001					

Tabla 5. Características cariotípicas de las especies de *Lathyrus* obtenidas por bandeo fluorescente DAPI e hibridación *in situ* fluorescente de ADNr 5S y 45S. **DAPI⁺**: promedio de la cantidad total de heterocromatina DAPI⁺ expresada como longitud absoluta en μm y entre paréntesis como porcentaje de la longitud total del complemento haploide. **Bandas DAPI⁺ centroméricas, proximales, intersticiales y distales:** se indican como el número total por complemento haploide y entre paréntesis el par y brazo cromosómico. Para los *loci* ADNr se indica el número de loci por complemento haploide y separado por punto y coma la posición de los mismos. **(P):** proximal **(I):** intersticial **(D):** distal. **p:** brazo corto, **q:** brazo largo. Los asteriscos distinguen a las especies anuales. Las letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas en los valores promedio de heterocromatina DAPI⁺ ($p < 0,05$), obtenidos por el test de Tukey.

<i>Lathyrus</i>	DAPI ⁺	Bandas Centroméricas	Bandas Proximales	Bandas Intersticiales	Bandas Distales	N° total de bandas	5S ADNr	45S ADNr
Secc. Notolathyrus								
<i>L. cabrerianus</i>	5,05 ^f (9,60 %)	7	0	0	0	7	1; 6-p (P)	1; 7-q (I)
<i>L. crassipes</i> *	1,12 ^a (2,24 %)	5 (1, 4, 5, 6, 7)	0	0	0	5	1; 2-q (I)	1; 7-q (I)
<i>L. hasslerianus</i>	2,23 ^{c,d,e,f} (3,64 %)	6 (2, 3, 4, 5, 6, 7)	1 (1-p)	0	0	7	1; 1-p (P)	1; 7-q (I)
<i>L. macrostachys</i>	3,30 ^{a,b} (5,00 %)	7	0	0	0	7	1; 2-p (D)	1 7-q (I)
<i>L. magellanicus</i> <i>var. magellanicus</i>	5,30 ^f (8,23 %)	7	0	0	0	7	1; 2-p (P)	1 7-q (D)
<i>L. multiceps</i>	7,44 ^{e,f} (14,59 %)	7	1 (1-q)	3 (1, 2, 3-q)	0	11	1; 4-p (P)	1 7-q (D)
<i>L. nervosus</i>	5,10 ^{bc} (8,74 %)	6 (1, 2, 4, 5, 6, 7)	1 (3 p)	-	-	7	1; 3-p (P)	1 7-q (D)

Continuación de la Tabla 5.

<i>Lathyrus</i>	DAPI ⁺	Bandas Centroméricas	Bandas Proximales	Bandas Intersticiales	Bandas Distales	N° total de bandas	5S ADNr	45S ADNr
Secc. Notolathyrus								
<i>L. nitens</i>	3,08 ^{a,b,c,d} (4,95 %)	7	0	0	0	7	1 2-p (P)	1 7-q (I)
<i>L. paranensis</i>	8,07 ^{a,b,c,d} (14,70 %)	7	2 (1, 6-q)	1 (7-q)	0	10	1 3-p (P)	1 7-q (D)
<i>L. pubescens</i>	4,65 ^{b,c,d,e,f} (7,38 %)	7	0	0	0	7	1 5-p (I)	1 7-q (I)
<i>L. tomentosus</i>	11,07 ^f (18,96 %)	7	2 (3, 5-q)	4 (2-p); (1, 6, 7-q)	2 (4-q); (6-p)	15	1 4-p (P)	1 7-q (D)
Secc. Lathyrus								
<i>L. latifolius</i>	19,57 ^h (20,91 %)	7	0	3 (1-p); (6, 7-q)	6 (1, 2, 3, 4, 5, 6-p)	16	1 4-p (P)	1 4-p (D)
<i>L. odoratus*</i>	5,04 ^{b,c,d,e} (10,13 %)	7	0	1 (4-p)	0	8	-	2 5, 6 p (D)
<i>L. sylvestris</i>	10,31 ^g (16,43 %)	5 (2, 4, 5, 6, 7)	0	3 (1, 6-p); (3-q)	6 (1, 2, 3, 4-p); (4, 6-q)	14	1 2-p (P)	1 2-p (I)
Secc. Orobus								
<i>L. japonicus</i>	3,50 ^{a,b,c} (8,30 %)	7	0	0	0	7	2 1-p (D); 2-p (P)	1 1-q (I)
ANOVA	F= 76,96							
	p=<0,0001							

Distribución de la heterocromatina

Los fluorocromos revelaron la presencia de heterocromatina CMA⁺/DAPI⁰ (en adelante heterocromatina CMA⁺) como bandas intersticiales o distales en un solo par de cromosomas, excepto en *L. odoratus* que presentó bandas terminales en dos pares cromosómicos (Fig. 6). Todas estas bandas se localizaron exclusivamente en las constricciones secundarias de los cromosomas en las que se mapearon los genes ADN_r 45S.

Asimismo, se detectó heterocromatina CMA⁰/DAPI⁺ (en adelante heterocromatina DAPI⁺) en diferentes patrones de bandas. Estas bandas variaron en número, tamaño y localización en cada uno de los taxones analizados. Todas las especies mostraron en sus complementos de cuatro a siete pares cromosómicos con bandas centroméricas DAPI⁺ (Tabla 5, Figs. 7 y 8, 11 y 12). Además, algunas especies de la sección *Notolathyrus* mostraron bandas proximales en los brazos cortos (*L. hasslerianus* y *L. nervosus*) o en los brazos largos (*L. tomentosus* y *L. paranensis*) (Tabla 5, Figs. 7 y 11). También se observaron bandas intersticiales en uno, en tres y en cuatro pares de cromosomas en *L. paranensis*, *L. multiceps* y *L. tomentosus*, respectivamente. La presencia de bandas distales en la sección *Notolathyrus* fue muy poco frecuente, presentándose únicamente en *L. tomentosus* (2). Dentro de las especies del Hemisferio Norte, los cromosomas de *L. japonicus* (sección *Orobus*) mostraron bandas heterocromáticas DAPI⁺ restringidas a las regiones centroméricas de todos los cromosomas. Las tres especies analizadas de la sección *Lathyrus* presentaron bandas heterocromáticas DAPI⁺ en los centrómeros de todos o de la mayoría de los cromosomas, aunque también mostraron bandas intersticiales tanto en brazos cortos como en brazos largos de al menos un par cromosómico (Tabla 5, Figs. 8 y 12). Las dos especies perennes de la sección *Lathyrus* también presentaron bandas distales en los brazos cortos o largos de cuatro o seis pares cromosómicos (Tabla 5, Figs. 8 y 12).

Dentro de la sección *Notolathyrus*, la cantidad total de heterocromatina DAPI⁺ varió desde 2,24 % (en *L. crassipes*) a 18,96 % (*L. tomentosus*) con respecto al largo total del complemento cromosómico haploide. Considerando todas las especies analizadas de las secciones, la cantidad de heterocromatina no estuvo relacionada con el largo total del complemento. Sin embargo, cuando se agruparon por un lado las especies con un complemento cromosómico mayor a 60 µm y por el otro, aquellas que presentaron un complemento cromosómico menor a 60 µm, se encontró una relación positiva dentro de cada grupo, aunque el coeficiente de correlación fue significativo sólo para el primero ($r = 0,72$; $p < 0,001$ y $r = 0,22$; $p < 0,001$, respectivamente). Por otra parte, no se observó correlación entre la longitud de la eucromatina y la longitud de la heterocromatina.

En lo que respecta a las secciones estudiadas que incluyen especies con diferentes ciclos de vida (*Lathyrus* y *Notolathyrus*), las especies anuales presentaron menor contenido de heterocromatina que las especies perennes. Además, la heterocromatina estuvo casi exclusivamente restringida a los centrómeros en las especies anuales, mientras que en las especies perennes las bandas heterocromáticas también fueron observadas en otras posiciones.

Genes ribosomales 45S y 5S

Los *loci* de ADN_r revelados por hibridación *in situ* fluorescente mostraron distintos patrones de distribución y tamaño entre las especies de diferentes secciones; no obstante, estos patrones fueron bastante conservados dentro de cada una de las secciones. En todas las especies de *Notolathyrus* se encontró un par de *loci* ADN_r 45S y un par de *loci* ADN_r 5S (Tabla 5, Fig. 9 y 11). Entre estas especies, los *loci* ADN_r 45S fueron mapeados en posición intersticial o distal y siempre se observaron en la constricción secundaria del brazo largo del par cromosómico *st*. La localización de los *loci* ADN_r 5S fue más variable, ya que se encontraron tanto en posición proximal, intersticial como distal. A diferencia de los *loci* ADN_r 45S, la localización de los *loci* ADN_r 5S siempre fue en los brazos cortos de diferentes pares cromosómicos excepto del par *st*.

Dentro de la sección *Lathyrus*, las dos especies perennes analizadas presentaron un par de *loci* ADN_r 45S y un par de *loci* ADN_r 5S (Tabla 5, Figs. 10 y 12). Estos dos *loci* mapearon en los brazos cortos de los pares 4 y 2 de *L. latifolius* y *L. sylvestris*, respectivamente. En *L. odoratus* se observaron dos pares distales de *loci* ADN_r 45S ubicados en los pares cromosómicos 4 y 5.

Lathyrus japonicus (sección *Orobus*) presentó dos pares de *loci* 5S ADN_r localizados en los brazos cortos de los cromosomas 1 y 2. Un par de *loci* ADN_r 45S fue detectado en los brazos largos del par cromosómico 1 (Tabla 5, Figs. 10 y 12).

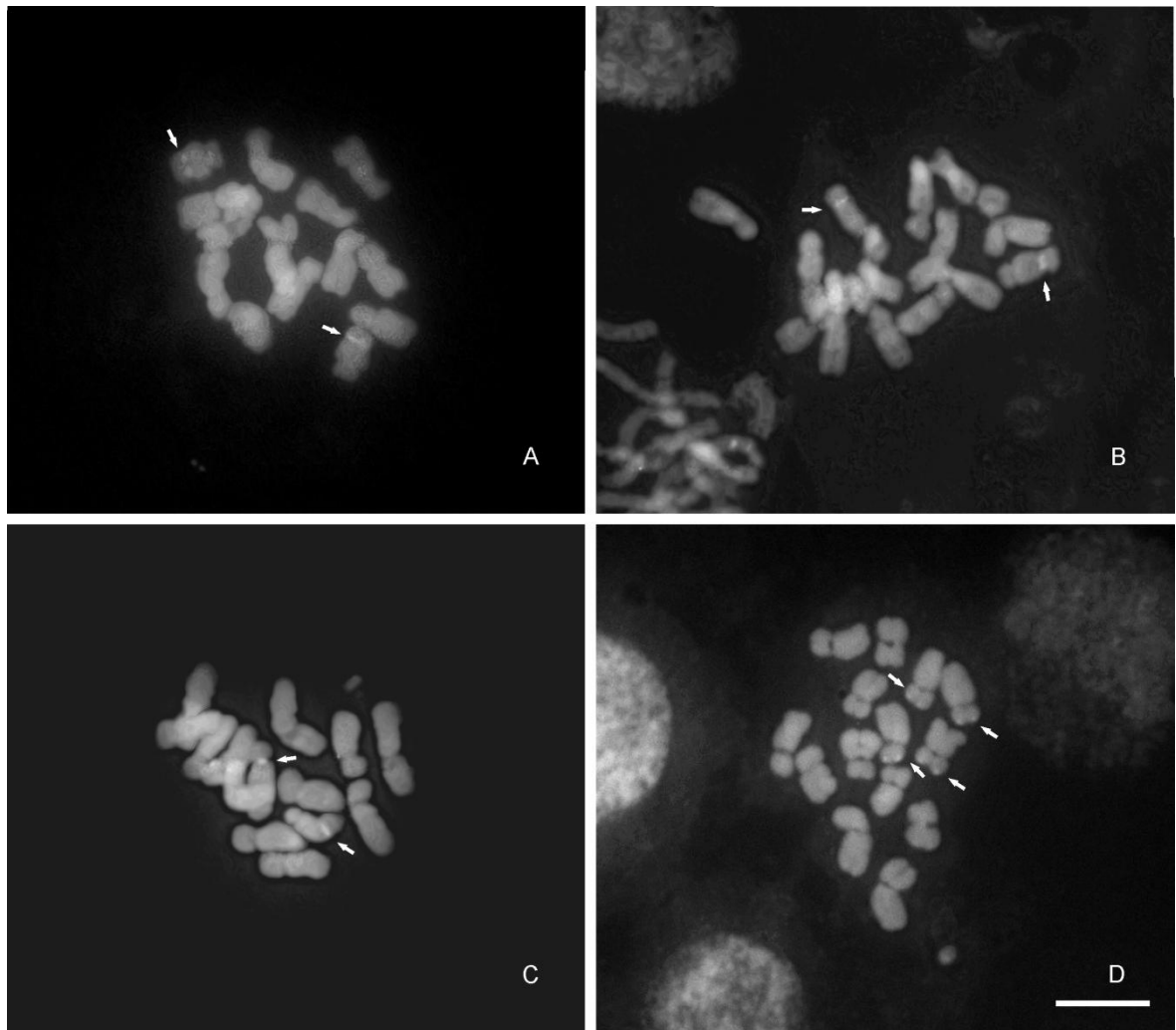


Figura 6. Patrones de bandas CMA⁺/DAPI⁰ en algunas especies de *Lathyrus*. **A-C:** Sección Notolathyrus, **D:** Sección Lathyrus. **A:** *L. crassipes*, **B:** *L. nervosus*, **C:** *L. pubescens*, **D:** *L. odoratus*. Las flechas marcan las bandas CMA⁺/DAPI⁰. Barra = 10 μ m.

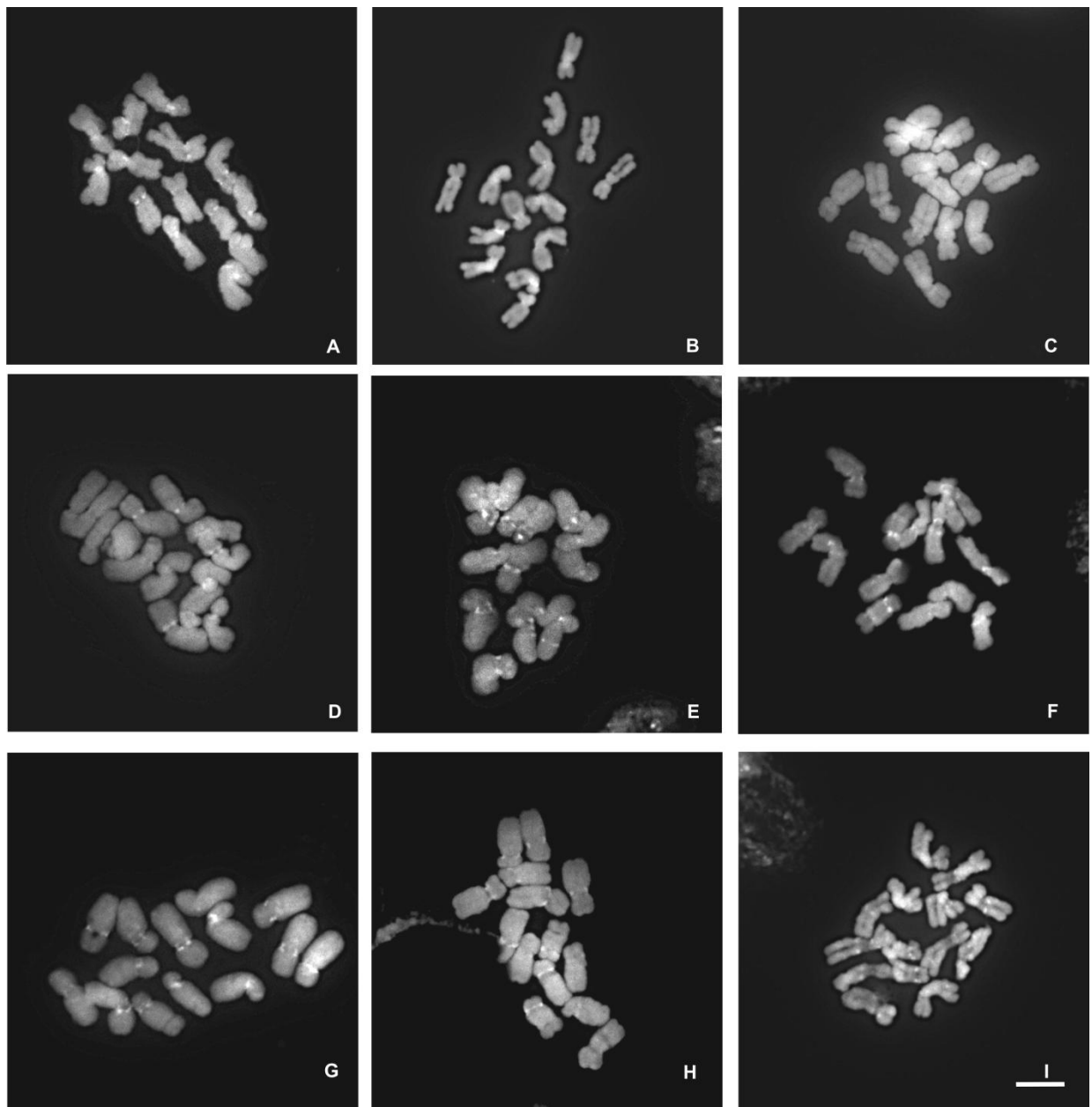


Figura 7. Patrones de bandas CMA⁰/DAPI⁺ en diferentes especies de Notolathyrus. **A:** *L. cabrerianus*, **B:** *L. crassipes*, **C:** *L. hasslerianus*, **D:** *L. macrostachys*, **E:** *L. magellanicus* var. *magellanicus*, **F:** *L. nervosus*, **G:** *L. nitens*, **H:** *L. pubescens*, **I:** *L. tomentosus*. Barra = 10 μ m.

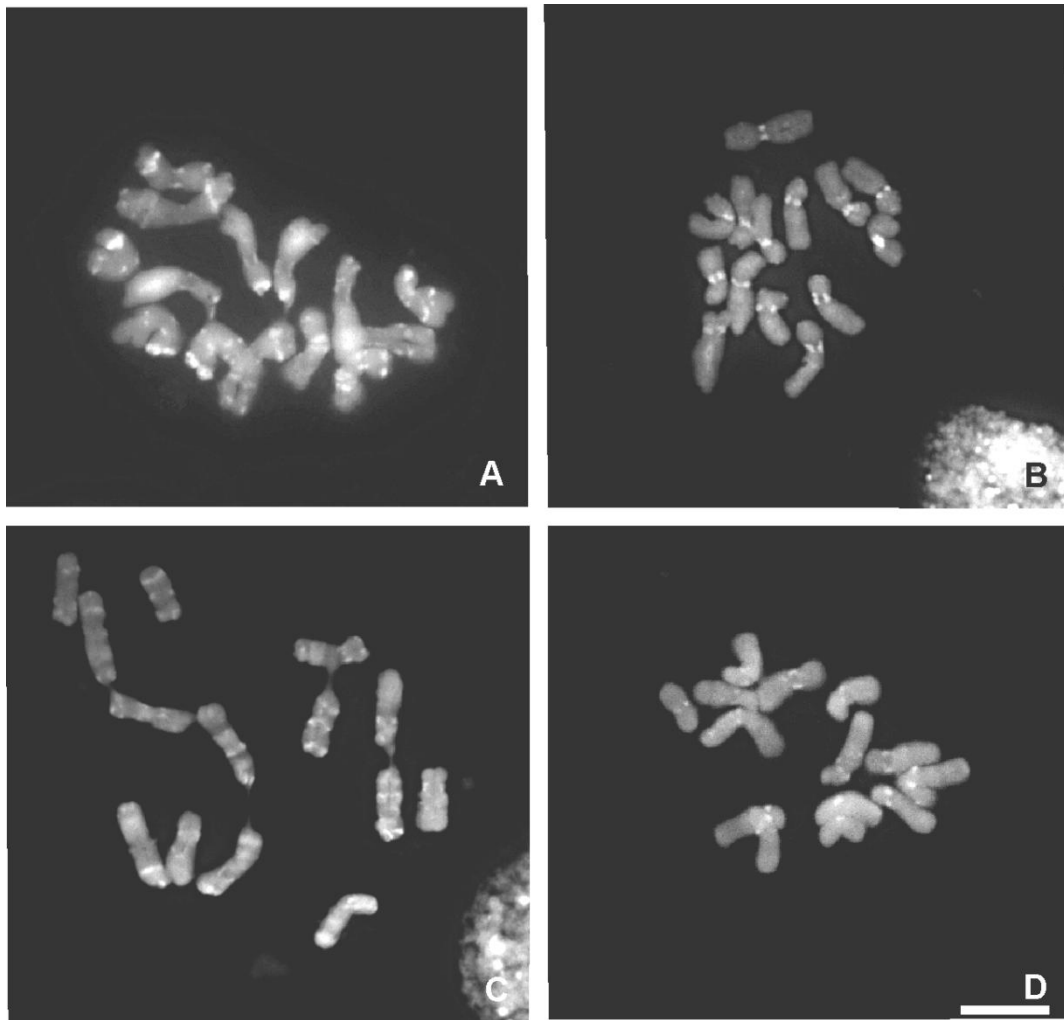


Figura 8. Patrones de bandas obtenidos por tinción directa con CMA⁰/DAPI⁺ en algunas especies de las secciones Lathyrus y Orobus. **A-C:** Sección Lathyrus, **D:** Sección Orobus, **A:** *L. latifolius*, **B:** *L. odoratus*, **C:** *L. sylvestris*, **D:** *L. japonicus*. Barra = 10 μ m.

Contenido de ADN nuclear

Las mediciones del contenido de ADN realizadas en 14 especies de *Lathyrus* y en los estándares (Tabla 6), utilizando citometría de flujo, arrojaron picos bien definidos (Fig. 14).

El contenido 2C de ADN nuclear estimado para las especies de *Lathyrus* analizadas varió desde 12,50 a 23,21 pg (Tabla 6). Esta variación representó una diferencia en el tamaño genómico de casi dos veces (1,85) entre las especies. Dentro de la sección Notolathyrus, *L. crassipes* (especie anual) presentó el menor contenido de ADN (12,50 pg), mientras que en las especies perennes se observó un rango de 15,7 a 21,32 pg con un valor promedio de 18,69 pg. La diferencia máxima de los valores 2C entre todas las especies de esta sección fue de 1,70 veces, mientras que entre las especies perennes fue de 1,37 veces. La variación entre el valor 2C de la especie anual y el valor promedio de las especies perennes fue de 1,49 veces.

De acuerdo a los valores del contenido de ADN en diferentes especies, Narayan (1982) identificó cuatro grupos, en la Tabla 6 se muestra en cuales de estos grupos estarían representadas las especies sudamericanas analizadas.

Dentro de la sección Lathyrus, la especie anual también presentó un valor en el contenido de ADN significativamente más bajo que las perennes (Tabla 6). El valor 2C obtenido para *L. japonicus* (sección Orobus) fue intermedio entre los valores obtenidos para las especies anuales y perennes de las secciones Notolathyrus y Lathyrus (Tabla 6).

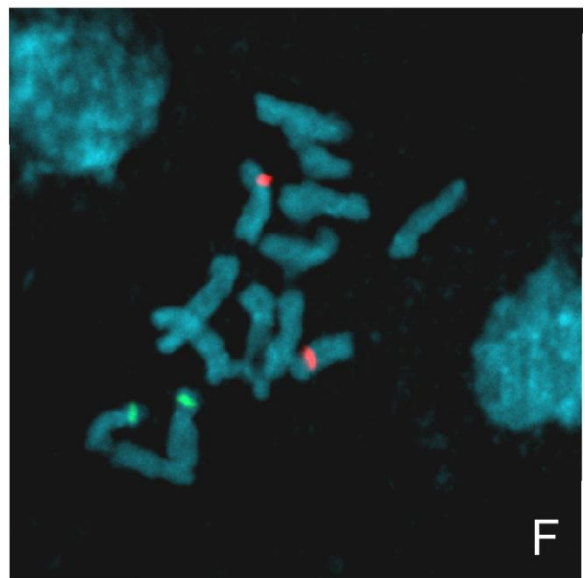
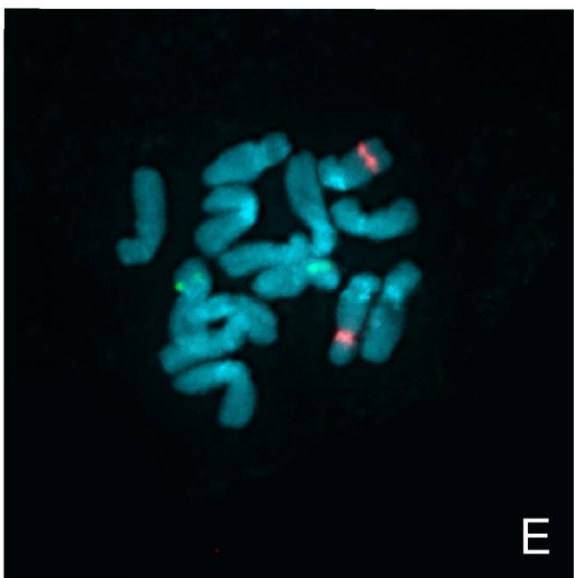
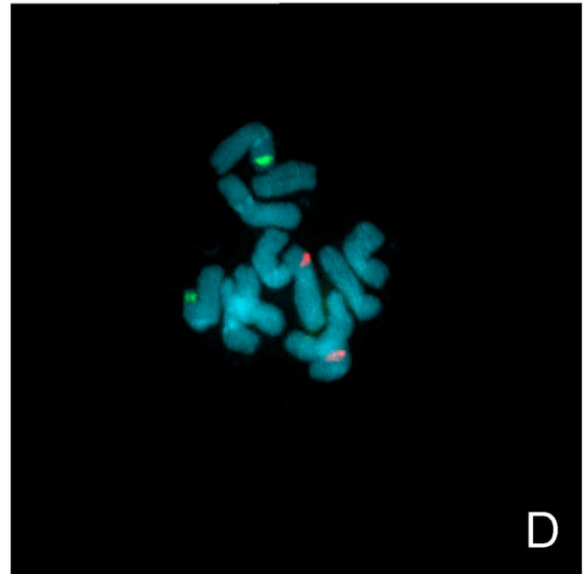
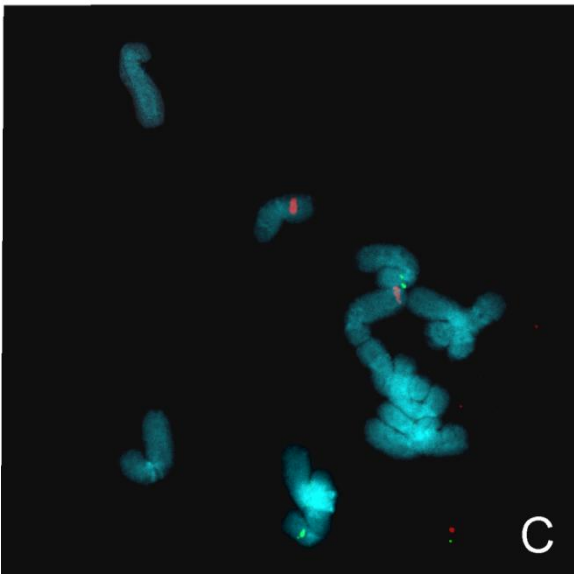
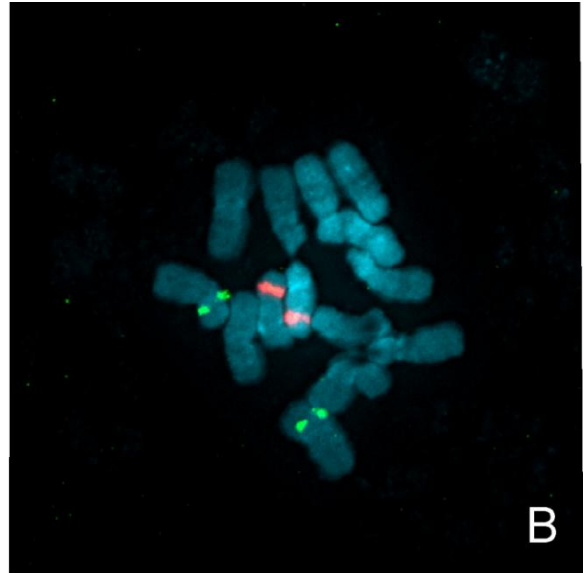
La comparación entre las secciones, mostró que la especie anual y las perennes de la sección Lathyrus presentaron mayor contenido de ADN que la especie anual y las perennes de la sección Notolathyrus, respectivamente. *Lathyrus japonicus*, de la sección Orobus, mostró el valor más bajo de contenido de ADN de todas las especies perennes analizadas en este trabajo.

Considerando exclusivamente a todas las especies de Notolathyrus, el contenido de ADN fue correlacionado positiva y significativamente con la longitud total del complemento ($r = 0,51$; $p = 7,6 \times 10^{-6}$). Sin embargo, el análisis de correlación entre el contenido de ADN y la cantidad (longitud) de eucromatina mostró valores de r muy bajos ($r = 0,28$; $p = 0,02$). Asimismo, la relación entre el contenido de ADN y la heterocromatina total no fue significativa considerando a todas las especies de Notolathyrus. Sin embargo, cuando las especies perennes con los valores de heterocromatina más altos (*L. paranensis* y *L. tomentosus*) y más bajo (*L. hasslerianus*) fueron excluidas del análisis, la correlación aumentó ($r = 0,64$).

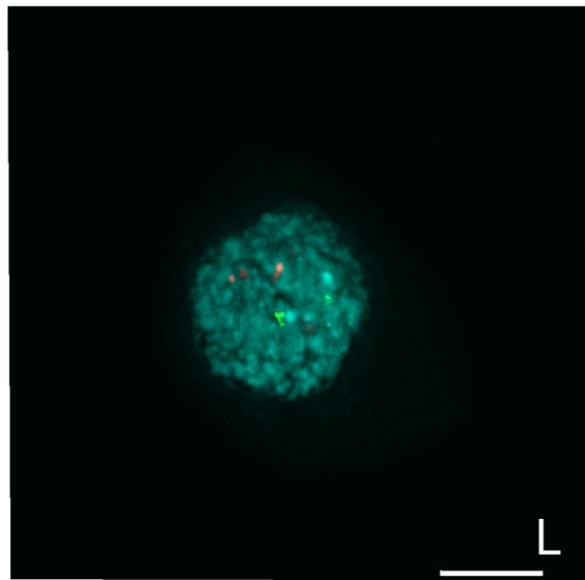
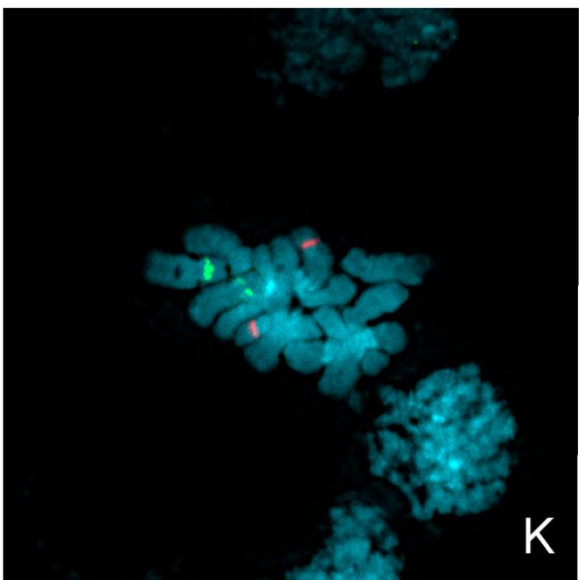
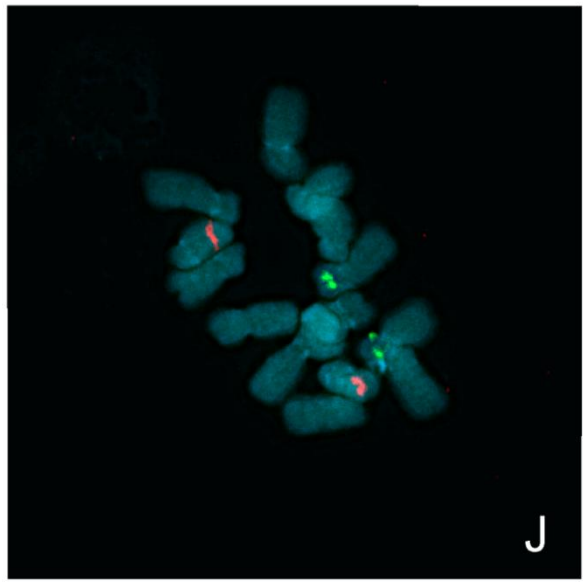
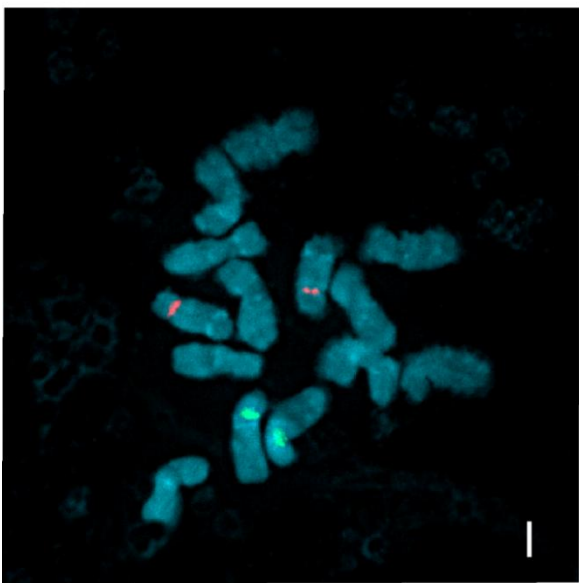
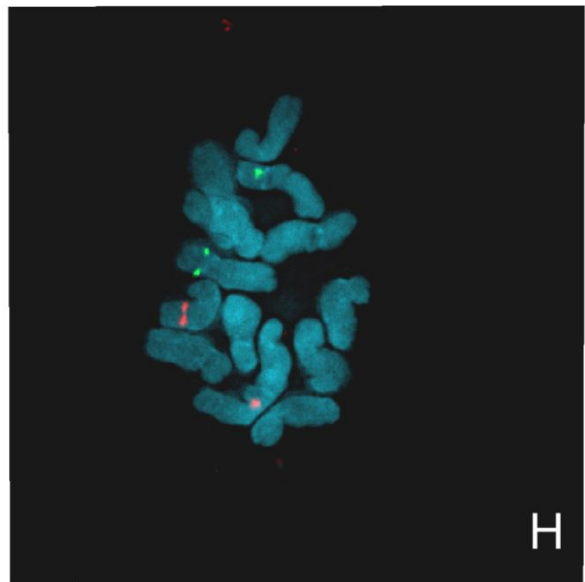
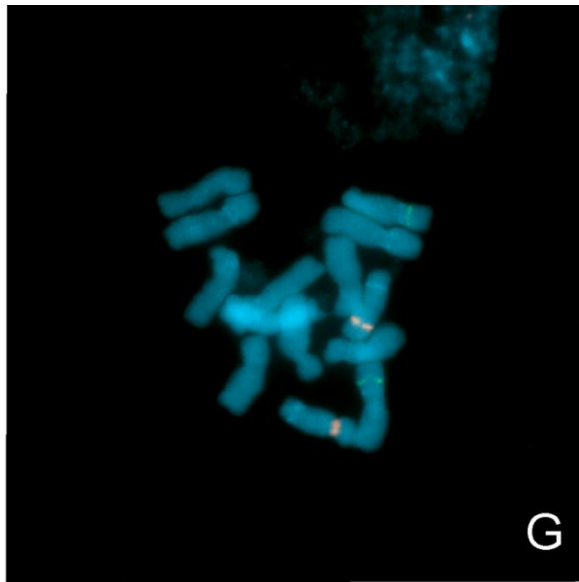
Tabla 6. Contenido de ADN 2C en las especies de *Lathyrus* analizadas. Las letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas de los valores promedio del contenido de ADN ($p < 0,05$), obtenidos por el test de Tukey. Grupo: hace referencia a los grupos de especies de *Lathyrus* con diferentes contenidos de ADN según Narayan (1982). Los asteriscos (*) distinguen a las especies anuales. Todos los valores fueron obtenidos en esta tesis, excepto aquellos en los que se indica la fuente de los datos.

<i>Lathyrus</i>	2C (pg)	Grupo	Fuente
Secc. Notolathyrus			
<i>L. cabrerianus</i>	21,32 ^f ± 0,08	3	
<i>L. crassipes</i> *	12,50 ^a ± 0,15	1	
<i>L. hasslerianus</i>	21,33 ^f ± 0,16	3	
<i>L. macropus</i>	15,63 ^c ± 0,31	2	
<i>L. macrostachys</i>	17,31 ^d ± 0,41	2	
<i>L. magellanicus</i> var. <i>magellanicus</i>	18,38 ^e ± 0,06	2	
<i>L. multiceps</i>	20,67 ^f ± 0,09	3	
<i>L. nervosus</i>	17,28 ^c ± 0,33	2	
<i>L. paranensis</i>	15,70 ^c ± 0,60	2	
<i>L. pubescens</i>	17,28 ^d ± 0,29	2	
<i>L. tomentosus</i>	17,34 ^d ± 0,35	2	
<i>L. subulatus</i>	14,81 ^b ± 0,37	2	
Secc. Lathyrus			
<i>L. latifolius</i>	23,21 ^g ± 0,62		
<i>L. odoratus</i> *	15,55 ^c		Murray <i>et al.</i> 1992
<i>L. sylvestris</i>	22,95 ^g		Rees y Hazarika 1969
Secc. Orobus			
<i>L. japonicus</i>	14,45 ^b ± 0,27		
ANOVA	F= 565,67 p=<0,0001		

Figura 9. Doble hibridación *in situ* fluorescente con sondas ribosomales en metafases somáticas de algunas especies de la sección Notolathyrus. Sobre los cromosomas, las señales fluorescentes en verde (FICT) corresponden a los sitios de hibridación de la sonda para los genes ADNr 5S y en rojo (TRICT) a los sitios de hibridación de la sonda para los genes ADNr 45S. La contratinción con DAPI (azul claro), después del procedimiento de FISH se utilizó para resaltar las bandas heterocromáticas y para teñir la eucromatina. Sección Notolathyrus. **Lámina A:** **A:** *L. cabrerianus*, **B:** *L. crassipes*, **C:** *L. hasslerianus*, **D:** *L. macrostachys*, **E:** *L. magellanicus* var. *magellanicus*, **F:** *L. multiceps*, **Lámina B:** **G:** *L. nervosus*, **H:** *L. nitens*, **I:** *L. paranensis*, **J:** *L. pubescens*, **K y L:** metafase y núcleo de *L. tomentosus*, respectivamente. Barra = 10 μm .



Lamina A



Lamina B

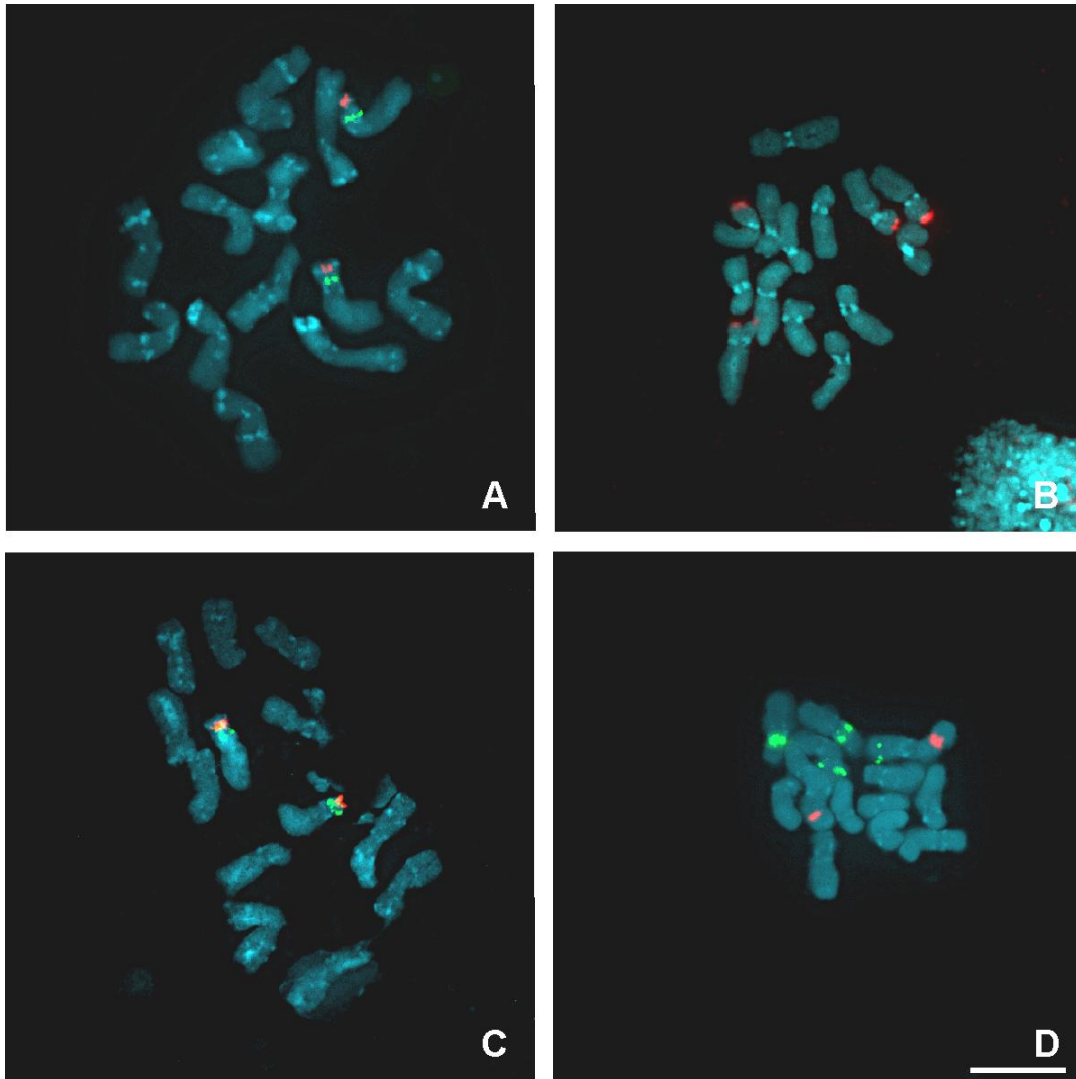


Figura 10. Doble hibridación *in situ* fluorescente con sondas ribosomales en metafase de especies de las secciones Lathyrus y Orobus. Sobre los cromosomas, las señales fluorescentes en verde (FICT) corresponden a los sitios de hibridación de la sonda para los genes ADNr 5S y en rojo (TRICT) a los sitios de hibridación de la sonda para los genes ADNr 45S. La contratinción con DAPI (azul claro), después del procedimiento de FISH se utilizó para resaltar las bandas heterocromáticas y para teñir la eucromatina. **A-C:** Sección Lathyrus, **D:** Sección Orobus, **A:** *L. latifolius*, **B:** *L. odoratus*, **C:** *L. sylvestris*, **D:** *L. japonicus*. Barra = 10 μ m.

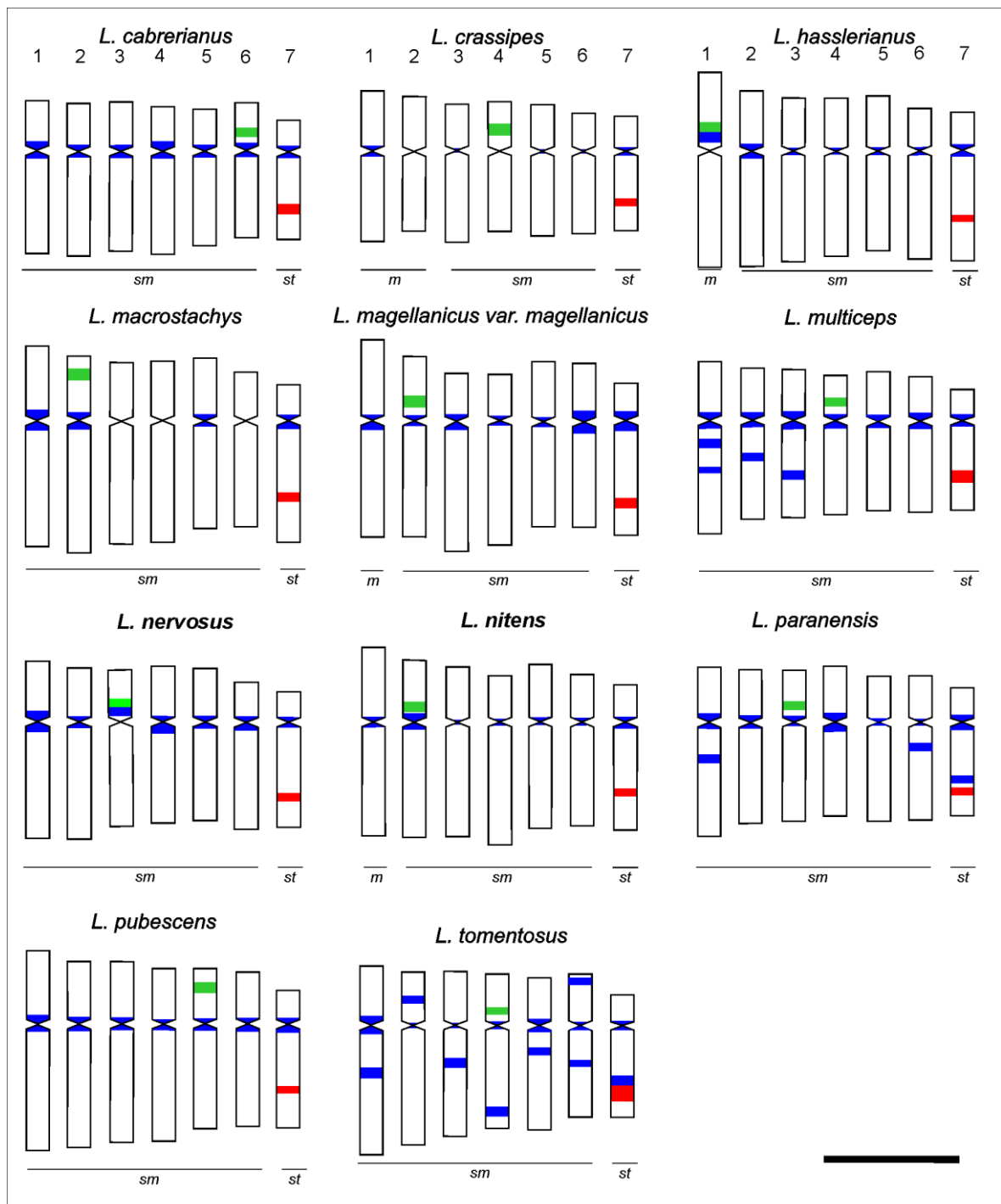


Figura 11. Idiogramas de las especies analizadas de la sección *Notolathyrus*. Los cromosomas fueron ordenados por su morfología y luego por su tamaño en orden decreciente. En rojo se representan los *loci* de ADNr 45S, en verde los *loci* de ADNr 5S y en azul las bandas heterocromáticas DAPI⁺, obtenidas luego de la contratinción. Las bandas CMA⁺ son coincidentes con los sitios ADNr 45S. Barra = 10 μ m.

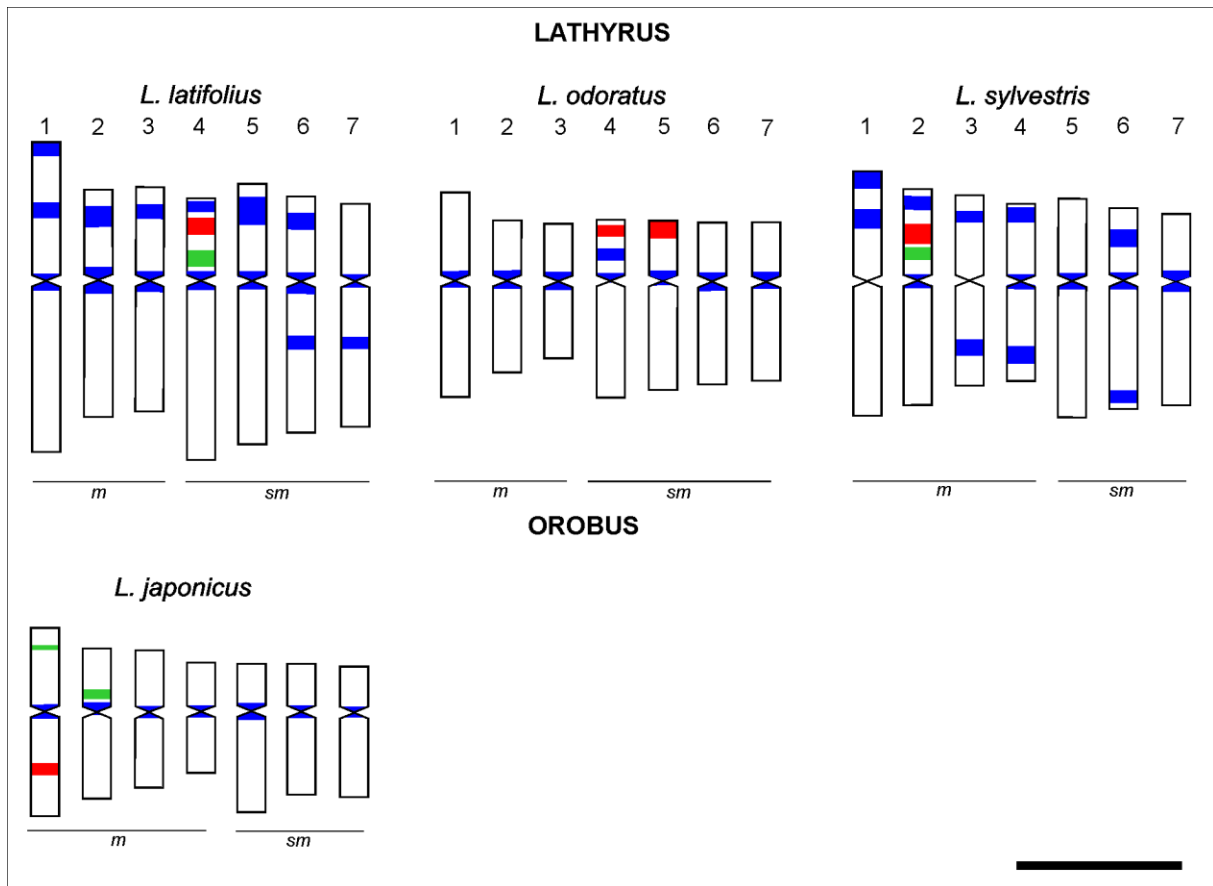


Figura 12. Idiogramas de las especies analizadas de las secciones Lathyrus y Orobus. Los cromosomas fueron ordenados por su morfología y luego por su tamaño en orden decreciente. En rojo se representan los *loci* de ADNr 45S, en verde los *loci* de ADNr 5S y en azul las bandas heterocromáticas DAPI⁺, obtenidas luego de la contratinción. Las bandas CMA⁺ son coincidentes con los sitios ADNr 45S Barra = 10 μ m.

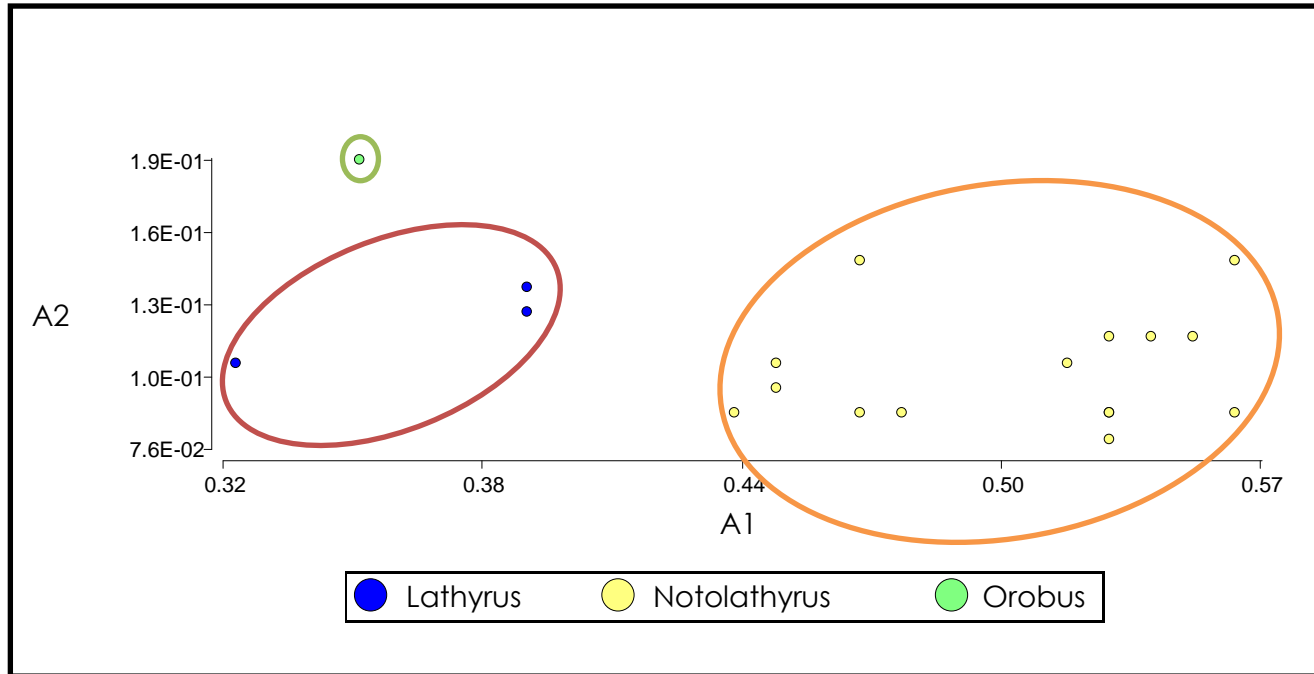
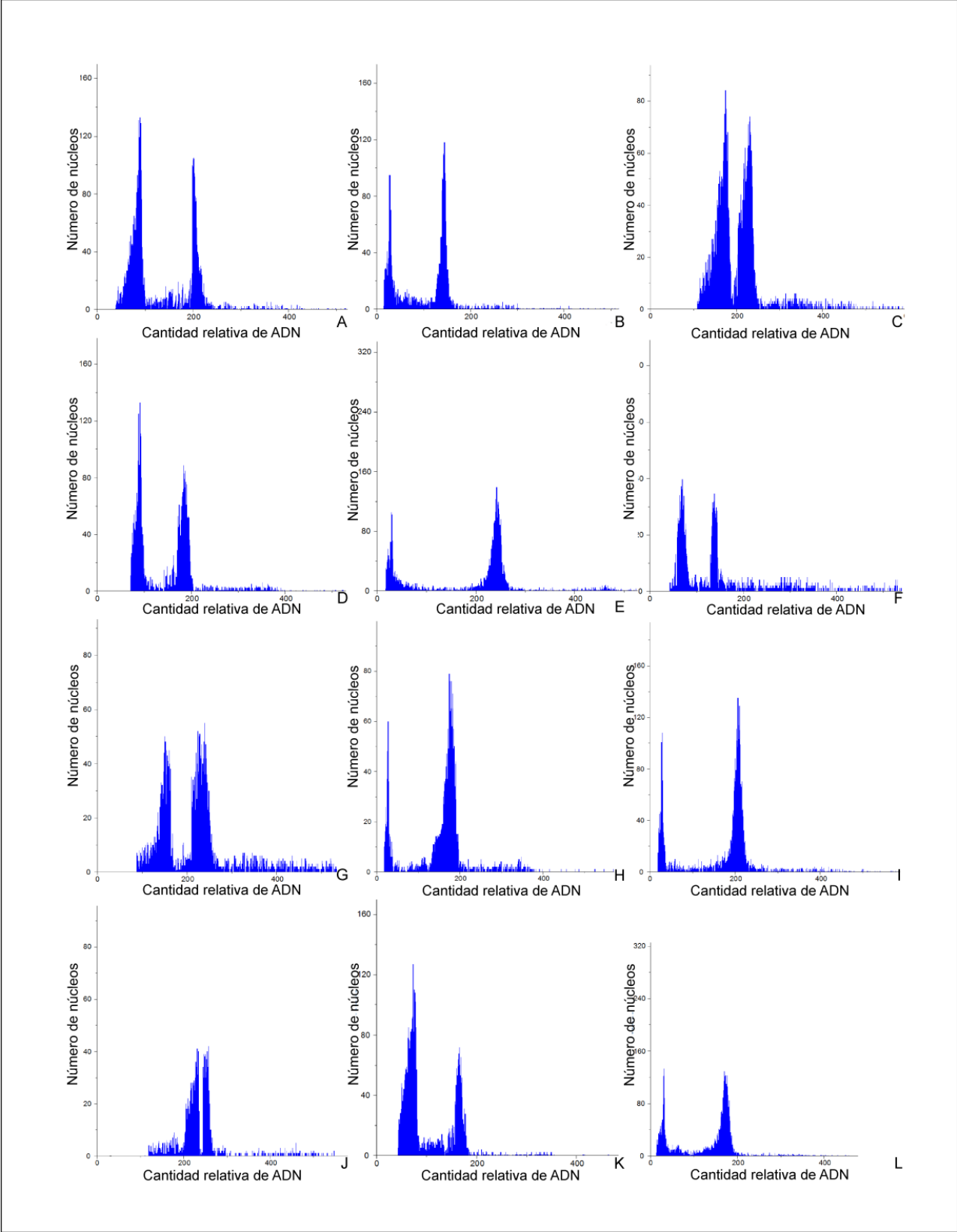


Figura 13. Diagrama de dispersión de los índices de asimetría A_1 y A_2 de Romero Zarco (1986).

Figura 14. Histogramas de contenido de ADN de las especies de *Lathyrus* analizadas, obtenidos por análisis de citometría de flujo de núcleos teñidos con PI. **A:** *L. cabrerianus*, **B:** *L. crassipes*, **C:** *L. hasslerianus*, **D:** *L. macropus*, **E:** *L. macrostachys*, **F:** *L. magellanicus*, **G:** *L. multiceps*, **H:** *L. nervosus*, **I:** *L. nitens*, **J:** *L. paranensis*, **K:** *L. pubescens*, **L:** *L. tomentosus*. En cada histograma el pico de la izquierda representa las muestras de las especies de *Lathyrus* y el pico de la derecha al patrón de referencia.



DISCUSIÓN

Características cariotípicas generales

Las fórmulas cariotípicas establecidas en este Capítulo para *L. cabrerianus*, *L. crassipes*, *L. hasslerianus*, *L. magellanicus* var. *magellanicus* y *L. latifolius* fueron coincidentes con las fórmulas propuestas por Seijo y Fernández (2003). Sin embargo, las fórmulas cariotípicas obtenidas para las otras especies fueron levemente diferentes de las citadas previamente por otros autores utilizando tinción de Feulgen (Battistin y Fernández 1994, Klamt y Schifino-Wittmann 2000, Seijo y Fernández 2003). Las diferencias en estas fórmulas podrían deberse a pequeños cambios en la morfología cromosómica causada por la tinción con fluorocromos o por la incubación en proteinasa de los preparados durante el pretratamiento de FISH (Schwarzacher y Heslop-Harrison 2000). El número cromosómico y los datos cariotípicos obtenidos para *L. nitens* constituyen los primeros datos citogenéticos para la especie. Las fórmulas cariotípicas observadas para las especies del Hemisferio Norte fueron, en general, concordantes con los datos previamente publicados (Narayan 1982, Ünal *et al.* 1995, Ali *et al.* 2000, Badr 2007).

De acuerdo a los datos cariotípicos, las especies sudamericanas constituyen un grupo homogéneo y distinto de las especies de otras secciones analizadas en esta tesis y de aquellas analizadas en publicaciones previas (Yamamoto *et al.* 1984, Murray *et al.* 1992, Ünal *et al.* 1995, Ali *et al.* 2000, Seijo y Fernández 2003). Estos resultados son consistentes con la delimitación taxonómica de la sección *Notolathyrus* propuesta por Kupicha (1983). Los datos cromosómicos aquí obtenidos, en conjunto con los publicados anteriormente, sugieren que *Notolathyrus* constituiría un grupo monofilético.

El análisis de los índices de asimetría A_1 y A_2 evidenció que las especies de América del Sur presentan cariotipos con un mayor grado de asimetría que las especies del Hemisferio Norte. Dado que las especies de América del Norte (Sección *Orobus*) y las de Eurasia y Norte de África, consideradas ancestrales con respecto a las de Sudamérica (Asmussen y Liston 1998, Kenicer *et al.* 2005), presentan cariotipos simétricos, el incremento de la asimetría en *Notolathyrus* podría considerarse como un carácter derivado. Sin embargo, los datos de morfología cromosómica no son suficientes para identificar al grupo ancestral del cuál habrían derivado las especies sudamericanas.

El análisis comparativo de la longitud del complemento haploide demostró que existe una diferencia de 15,8 μm entre el complemento más largo y el más corto entre las especies de la sección *Notolathyrus*. Esta diferencia de longitud representa el 30 % de la

longitud total del cariotipo y equivale al menos a dos cromosomas de tamaño promedio de los complementos de *Lathyrus*. Estos datos evidencian que la variación en el tamaño genómico ha constituido uno de los cambios más relevantes durante la divergencia y evolución de los complementos cromosómicos en *Notolathyrus*. Si bien estos resultados son consistentes con la tendencia general observada al considerar los volúmenes cromosómicos de ocho especies de distintas secciones de *Lathyrus* (Narayan y Rees 1976), los datos obtenidos en esta tesis constituyen el primer análisis exhaustivo a nivel intraseccional.

Bandeo cromosómico

El análisis de la distribución de la heterocromatina realizado permitió establecer las primeras comparaciones cromosómicas detalladas entre las especies sudamericanas y de éstas con las especies de otras secciones de *Lathyrus*. La presencia de bandas heterocromáticas centroméricas DAPI⁺ en todos o en la mayoría de los cromosomas de los complementos de casi todas las especies de *Notolathyrus*, así como de las especies de las demás secciones analizadas, apoyan la hipótesis que considera a la presencia de bandas centroméricas en la mayoría de los cromosomas del complemento como un carácter plesiomórfico dentro del género (Ünal *et al.* 1995). Por lo tanto, las especies que presentan disminución en el número de cromosomas con bandas centroméricas (como *L. macrostachys* y *L. crassipes*) deberían considerarse como derivadas.

Para las especies analizadas del Hemisferio Norte, los patrones de bandas DAPI⁺ fueron similares a los patrones de bandas C y Q que se registraron anteriormente para *L. latifolius*, *L. odoratus* y *L. sylvestris* (Verma 1978, Lavania y Sharma 1980, Ünal *et al.* 1995). Las pequeñas diferencias encontradas podrían deberse a los diferentes métodos utilizados para la discriminación de la heterocromatina y/o a la existencia de variaciones estructurales interespecíficas. Los datos obtenidos para *L. japonicus* constituyen los primeros aportes realizados en la sección *Orobus*.

La presencia de bandas DAPI⁺ intersticiales y distales en los brazos largos de las especies de la sección *Notolathyrus* es una característica en común con algunas especies del viejo mundo de las secciones *Lathyrus* y *Clymenum* (Ünal *et al.* 1995, Ali *et al.* 2000). Si esta característica compartida es considerada como indicadora de una relación filogenética más cercana de *Notolathyrus* con los grupos de Europa que con *Orobus* de Norteamérica, los patrones de bandeo apoyarían la hipótesis que considera a la dispersión a larga distancia como el mecanismo más probable para explicar el origen de las especies de

América del Sur. Alternativamente, si se considera la hipótesis que plantea a las especies sudamericanas como derivadas de los representantes de América del Norte de la sección *Orobus*, la presencia de patrones similares de heterocromatina en las especies de *Notolathyrus* y en las europeas (sección *Lathyrus* y *Clymenum*), debería explicarse por evolución paralela.

El análisis de heterocromatina rica en GC realizado en este estudio, utilizando CMA, constituye el primer aporte al respecto para el género. La presencia de bandas heterocromáticas CMA⁺ localizadas en las constricciones secundarias de sólo un par de cromosomas (excepto en *L. odoratus* que se presenta dos pares cromosómicos, en posición terminal) es coincidente con el patrón más frecuentemente observado en las plantas (Berg y Greilhuber 1992, Galasso *et al.* 2001). En estos casos, las bandas CMA⁺ corresponden a la heterocromatinización de las regiones lindantes a los genes ADN_r que presentan una proporción relativamente alta de GC (Galasso *et al.* 1996, Cerbah *et al.* 1998, Guerra 2000).

En contraste con los numerosos estudios que muestran una gran similitud de los cariotipos entre las especies de *Lathyrus* utilizando tinción no diferencial (Lavania y Sharma 1980, Narayan y Durrant 1983, Klamt y Schifino-Wittmann 2000), los patrones de bandas DAPI⁺ obtenidos en esta tesis fueron diferentes para cada una de las 15 especies. Estas variaciones fueron significativas no sólo en la cantidad total de heterocromatina sino que también en el patrón de distribución, tamaño e intensidad de las bandas. Esto demuestra que el establecimiento de los patrones de heterocromatina tiene un alto valor taxonómico para la sección *Notolathyrus* y para el género. Desde un punto de vista citogenético, los patrones de bandas DAPI⁺ proveyeron nuevos marcadores cromosómicos que facilitaron la identificación precisa de la mayoría de los pares de cromosomas homólogos dentro de cada complemento cromosómico.

En cuanto al contenido total de heterocromatina observado en las especies sudamericanas, aquellas que viven en los bosques patagónicos a altas latitudes (*L. magellanicus*, *L. multiceps* y *L. cabrerianus*) tienen valores medios de heterocromatina, las que viven en las latitudes medias tienen el valor más alto (*L. tomentosus* y *L. paranensis*) o valores medios de heterocromatina (*L. nervosus*, *L. pubescens* y *L. nitens*), mientras que las que viven en las zonas subtropicales, por lo general, en planicies inundables o parches de bosques abiertos, tienen los valores más bajos de heterocromatina (*L. macrostachys*, *L. hasslerianus* y *L. crassipes*). A pesar de no haber una relación clara entre el contenido de heterocromatina y la latitud, es evidente que las especies subtropicales tienden a poseer

valores más bajos de heterocromatina comparadas con aquellas especies que viven en latitudes medias y altas. Si bien se han identificado relaciones directas entre las clinas geográficas y climáticas de algunos grupos de plantas con el contenido de ADN (Bennett 1976, Poggio *et al.* 1998), la relación existente con el contenido de heterocromatina es poco conocida. Asimismo, el significado adaptativo de la variación en el contenido de heterocromatina dentro de los grupos de plantas aún permanece como un gran interrogante.

En grupos de plantas compuestos por especies anuales y perennes, el contenido de heterocromatina puede variar de manera diferente (Nagl y Erhendorf 1974) pero, en general, las plantas perennes presentan mayor cantidad de heterocromatina que las anuales (Lavania y Sharma 1980). Consistentemente, las especies perennes de las secciones *Notolathyrus* y *Lathyrus* tienen más heterocromatina que las especies anuales. En la sección *Notolathyrus*, la diferencia en el contenido de heterocromatina entre las especies anuales y las perennes se debe no sólo a la ausencia completa de bandas intersticiales y distales en las plantas anuales en contraposición a las especies perennes, sino también al número y tamaño de las bandas centroméricas. En la sección *Lathyrus*, la principal diferencia en el contenido de heterocromatina no fue sólo debido al tamaño y al número de bandas heterocromáticas centroméricas, sino a la ausencia de bandas heterocromáticas intersticiales en las especies anuales.

Se ha propuesto que la distribución de heterocromatina en los cromosomas está asociada al tamaño de los mismos (Schweizer y Loidl 1987, Guerra 2000). En general, la acumulación de heterocromatina en las bandas intersticiales es mucho más común en los cromosomas grandes que en los pequeños. Por el contrario, las bandas centroméricas son, en términos generales, más frecuentes en los cariotipos con cromosomas pequeños. Esta tendencia se observa claramente en *Lathyrus*, ya que en las especies anuales, que presentan cariotipos más pequeños, la heterocromatina se concentra principalmente en los centrómeros, mientras que en las plantas perennes, con cariotipos de mayor longitud (1,30 a 1,54 veces más largos), las bandas heterocromáticas intersticiales son más frecuentes.

Mapeo de genes ribosomales

La hibridación *in situ* fluorescente de sondas para los *loci* ADNr 45S y 5S en cromosomas mitóticos fue útil para la identificación de pares cromosómicos de forma inequívoca. A pesar de que el análisis reveló variación en el número, tamaño y posición de los *loci* ADNr 45S entre las especies de las secciones estudiadas, el patrón de estos *loci* fue homogéneo para las especies dentro de la sección *Notolathyrus*. Este hecho ha determinado

que su utilidad en la caracterización de las especies sea limitada o nula. Sin embargo, la posición conservada de los *loci* ADNr 45S en los brazos largos del único par cromosómico subtlocéntrico constituyó un excelente marcador diagnóstico para las especies sudamericanas. Por el contrario, la presencia de los *loci* ADNr 5S en posiciones variables en las distintas especies de *Notolathyrus* ha permitido tanto el establecimiento de homeologías entre las especies como la identificación de algunas de ellas.

Entre las especies de la sección *Lathyrus*, los dos pares de *loci* ribosomales 45S observados en *L. odoratus* son coincidentes tanto en el número como en la posición de los *loci* identificados previamente para esta especie (Murray *et al.* 1992). Este patrón difiere significativamente de los publicados para las otras pocas especies anuales estudiadas de la sección *Lathyrus* (Ali *et al.* 2000), que presentan un *locus* único generalmente localizado en posición proximal o intersticial. El patrón observado en las especies perennes (*L. latifolius* y *L. sylvestris*) de la sección *Lathyrus* con localización de ambos *loci* (45S y 5S) en el mismo brazo cromosómico es un carácter exclusivo de las mismas. Por otra parte, la presencia de dos pares de *loci* ADNr 5S en diferentes cromosomas, uno de ellos en el mismo cromosoma en que se encuentra el clúster de ADNr 45S (pero en diferentes brazos), fue exclusivo para *L. japonicus*. Por lo tanto, los patrones de *loci* encontrados fueron diferentes para cada una de las secciones analizadas y, en muchos casos, permitieron la identificación de especies.

La homogeneidad en el número de *loci* ADNr 5S observado en esta tesis para la sección *Notolathyrus* no concuerda con el alto polimorfismo (1-4 *loci*) publicado para una pequeña muestra de especies de *Lathyrus* (Ali *et al.* 2000) y para otros géneros de la tribu *Fabeae* (Hall *et al.* 1997, Fuchs *et al.* 1998, Raina *et al.* 2001). Por el contrario, los números de *loci* ADNr 45S aquí observados son coincidentes con los citados en trabajos anteriores en el género *Lathyrus* y en la tribu *Fabeae*. La organización conservada de los genes de ADNr 45S en un sólo *locus* por complemento haploide (excepto en *L. sativus* y *L. odoratus* en las que se detectaron dos *loci*) (Murray *et al.* 1992, Staginuss *et al.* 1999, Ali *et al.* 2000) es compartida con el género *Vicia*, ya que la mayoría de las especies presentan uno y rara vez dos *loci* ADNr 45S (Raina *et al.* 2001). *Pisum sativum* y *Cicer arietinum* también presentan dos *loci* ADNr 45S (Fuchs *et al.* 1998), mientras que *Lens culinaris* tiene sólo un *locus* (Fuchs *et al.* 1998, Falistocco 2000, Galasso *et al.* 2001). Esto sugiere una gran estabilidad en el número de *loci* ADNr 45S no sólo a nivel de género sino también a nivel de tribu y que la presencia de sólo un *locus* por complemento haploide sería la condición ancestral.

Contenido de ADN

La mayoría de las leguminosas se caracterizan por tener genomas medianos o pequeños (Doyle y Luckow 2003); sin embargo, las especies de los géneros incluidos en la tribu Fabeae muestran un aumento drástico en el tamaño genómico a nivel diploide y una gran variación interespecífica (Poggio *et al.* 2008). En las especies aquí estudiadas de *Lathyrus*, el rango de los valores 2C (2C = 12,50 a 23,21 pg) cubrió casi el 50 % de la variación total del contenido de ADN observado en el género de 6,9 hasta 29,2 pg/2C (Bennett y Smith 1991), mientras que, el rango de variación detectado en las especies de *Notolathyrus* (2C = 12,50 a 21,33 pg) representó un 39 % del total de la variación encontrada para las especies de *Lathyrus*. Esto demuestra que las especies de *Notolathyrus* presentan valores medios de contenido de ADN con respecto a lo observado en otras especies del género *Lathyrus* y sugiere que el cambio en el contenido de ADN ha sido uno de los mecanismos más importantes en la evolución genómica de la sección.

La observación de un menor contenido de ADN en las especies anuales en comparación con las especies perennes de la sección *Notolathyrus* es compartida con la sección *Lathyrus* (esta tesis, Rees y Hazarika 1969). Considerando que las especies de la tribu Fabeae presentan contenidos de ADN mucho mayores que otras Leguminosas y que las especies anuales de *Lathyrus* son derivadas de la perennes, la reducción en el contenido de ADN ocurrida durante la transición de perenne a anual se habría alcanzado luego que el grupo (ancestral del género o de la tribu) alcanzara una cantidad óptima de ADN. Estos datos evidencian que durante la historia evolutiva de *Lathyrus* y de la tribu Fabeae se habrían producido cambios cíclicos en el contenido de ADN.

Los valores relativamente bajos de correlación ($r = 0,51$) encontrados entre la longitud total del complemento haploide y el tamaño del genoma podrían explicarse por la existencia de condensación diferencial de los segmentos cromosómicos presentes en los complementos de distintas especies.

Diversos estudios han demostrado que la variación en el contenido de ADN puede estar asociada con la variación en la cantidad de heterocromatina (Flavell 1986, Furuta y Nishikawa 1991). En concordancia, la variación en el contenido de ADN nuclear de las distintas especies de *Lathyrus* del Hemisferio Norte se acompaña de una variación correspondiente en la heterocromatina interfásica (Rees y Narayan 1977, Verma 1978) y en la heterocromatina estimada por bandas C en los cromosomas mitóticos (Lavania y Sharma 1980). Sin embargo, los resultados de esta tesis sobre especies sudamericanas están parcialmente de acuerdo con esos informes, ya que, a pesar de observarse una tendencia

similar, se detectó que el análisis de correlación entre el contenido de ADN y de heterocromatina fue significativa sólo cuando las especies con los valores más altos y los más bajos de heterocromatina se excluyeron del análisis. Esta ausencia de relación entre la cantidad de heterocromatina y la variación del contenido de ADN también ha sido detectada en otros géneros de la tribu Fabeae, como en *Cicer* (Tayyar *et al.* 1994, Venora *et al.* 1995), *Pisum* y *Lens* (Poggio *et al.* 2008). Estos datos sugieren que el ADN extra no siempre se acumula en forma de heterocromatina constitutiva sino que también se puede acumular como parte de la fracción eucromática.

Narayan y Rees (1976) y Rees y Narayan (1977) evidenciaron tempranamente, que la variación en el contenido de ADN nuclear observadas en algunos grupos de especies se debe principalmente a la fracción de ADN repetitivo. Lavania y Sharma (1980) plantearon la hipótesis que durante la evolución de las especies de *Lathyrus* se produjo una disminución gradual en el contenido total de ADN repetitivo acompañado de una reducción en la heterocromatina constitutiva. Sin embargo, en consistencia con los datos aquí obtenidos, los análisis de correlación de las fracciones de heterocromatina y de eucromatina versus el contenido total de ADN en cuatro especies de *Lathyrus* demostraron que los cambios en la cantidad de ADN implican variaciones en la cantidad de heterocromatina así como en la eucromatina (Narayan 1986).

La distribución del contenido de ADN de las especies perennes en dos grupos discretos separados entre sí por alrededor de 2 pg y del contenido de *L. crassipes* por casi la misma magnitud evidencian que la variación en el contenido de ADN en *Notolathyrus* no es gradual y que las brechas entre cada grupo son aproximadamente de la misma magnitud que las observadas para las especies del Hemisferio Norte (Narayan 1982). La comparación del contenido de ADN entre las especies de *Notolathyrus* y aquellas que se encuentran en el Hemisferio Norte (de acuerdo con los grupos establecidos por Narayan 1982) indica que *L. crassipes* puede estar incluida en el grupo 3. Este grupo se encuentra integrado por especies de las secciones Afaca, Nissolia, Clymenum, Orobastrum y Cicercula. Las especies perennes pueden ser incluidas dentro de los grupos 4 y 5 integrados por especies de la sección Cicercula y Eulathyrus.

El hecho de que grupos de especies de *Notolathyrus* establecidos según su contenido de ADN sean compatibles con las especies del Hemisferio Norte, indica que el contenido de ADN de cada grupo representa estados estables en la evolución del genoma del género, a pesar de la divergencia evolutiva existente entre las especies incluidas en cada uno de ellos. Se ha propuesto que las especies dentro de cada grupo que comparten valores de

contenido de ADN similares presentan un equilibrio o un balance similar en su organización nuclear (Narayan 1982). Las restricciones para cambios discontinuos en el ADN dentro de determinados grupos de especies son poco conocidas; pero cualquiera sea su naturaleza causal, la variación en el contenido de ADN nuclear parece ser un rasgo hereditario importante que contribuye a los aspectos fisiológicos, del desarrollo y de la adaptación de las especies como se ha establecido en la hipótesis nucleotípica (Bennett 1987).

CAPÍTULO III

VARIABILIDAD CROMOSÓMICA

INTERPOBLACIONAL

INTRODUCCIÓN

Los procesos de diferenciación genética que dan como resultado a la variabilidad intraespecífica, pueden ocurrir a diferentes niveles dentro del genoma durante el curso de la evolución. Los cambios genéticos que se pueden detectar a nivel cromosómico incluyen cambios numéricos y estructurales. Dentro de los cambios numéricos se incluyen aneuploidía, cromosomas supernumerarios o B y poliploidía (Stebbins 1971). Dentro de los cambios estructurales, se incluyen reordenamientos de grandes bloques cromosómicos que alteran la morfología de los cromosomas y que pueden detectarse con técnicas de coloración clásica (Darlington 1965), aunque también pueden ocurrir cambios estructurales que no modifican la morfología y que requieren de técnicas que revelen la subestructura de los cromosomas. Entre estos últimos se incluyen inversiones paracéntricas, pericéntricas isobraquiales, translocaciones recíprocas que involucran segmentos de cromosomas de igual tamaño, microinversiones y microtranslocaciones, cambios en el estado epigenético de la cromatina (heterocromatina versus eucromatina) y variación cuanti y cualitativa del ADN repetitivo, entre otros. Todos estos cambios reducen la homología cromosómica y pueden interferir en el normal apareamiento de los cromosomas en meiosis y conducir a la diferenciación cromosómica de las poblaciones (Stebbins 1971, White 1978, Grant 1981, King 1993).

En el caso particular de *Lathyrus*, la variación cromosómica intraespecífica ha sido investigada en dos especies cultivadas, *L. odoratus* y *L. sativus*; sin embargo, hasta el momento, no se han realizado estudios de variabilidad intraespecífica en especies silvestres del género. Los resultados publicados para las especies cultivadas utilizando tinción no diferencial son discordantes. Algunos autores plantean la existencia de una elevada estabilidad cromosómica intraespecífica, tanto en la fórmula cariotípica (Bhattacharjee

1954, Sharma y Datta 1959), como en el comportamiento meiótico (Verma y Ohri 1979), mientras que otros plantean la existencia de variabilidad a nivel poblacional (Murray *et al.* 1992, Arzani 2006).

Para el estudio de la variabilidad intraespecífica y de la evolución cromosómica en grupos con fórmulas cariotípicas semejantes, como *Lathyrus*, es necesario contar con marcadores adecuados que permitan analizar la subestructura cromosómica. Por esta razón, en este Capítulo se realiza un análisis detallado de los cariotipos y del comportamiento meiótico a nivel interpoblacional de *L. nervosus* (secc. *Notolathyrus*) analizando patrones de bandas heterocromáticas CMA/DAPI y el mapeo de genes ribosomales por FISH. Asimismo, se analizan el comportamiento meiótico y la viabilidad del polen en diversas poblaciones de la especie.

Lathyrus nervosus fue elegida como modelo de estudio debido a que presenta una amplia distribución geográfica en Argentina, Chile, Uruguay y Brasil. Su área de distribución comprende desde los bosques patagónicos al sur de la Cordillera de los Andes, hasta las sierras del sistema de Ventania y Tandilia en Argentina, Uruguay y Sur de Brasil (Fig. 15). El área abarca diferentes hábitats, que varían en el tipo de suelo, la temperatura y el tipo de vegetación, que podrían haber propiciado la fijación de diferentes rearrreglos cromosómicos en las poblaciones de esta especie. Los análisis planteados se llevaron a cabo en cinco poblaciones provenientes de diferentes localidades del área de distribución de la especie con los siguientes objetivos:

Objetivo General

Inferir los mecanismos de evolución cromosómica a nivel poblacional.

Objetivos particulares

- 1- Analizar el número cromosómico y la estructura cariotípica por técnicas de bandeo e hibridación *in situ* fluorescente en individuos pertenecientes a diferentes poblaciones
- 2- Inferir la ocurrencia de anormalidades cromosómicas mediante el análisis del comportamiento meiótico en diferentes poblaciones.
- 3- Analizar las consecuencias de los cambios cromosómicos en la viabilidad del polen.

Hipótesis

- 1- Los individuos pertenecientes a diferentes poblaciones de *Lathyrus nervosus* son homogéneos en número cromosómico y fórmula cariotípica, pero presentan variabilidad en la subestructura cromosómica.
- 2- Las mutaciones cromosómicas más importantes en la evolución del grupo corresponden al tipo estructural aunque difieren en tipo y frecuencia según las poblaciones analizadas.
- 3- Las mutaciones cromosómicas disminuyen significativamente la viabilidad del polen.

MATERIALES Y MÉTODOS

El análisis de variabilidad cromosómica intraespecífica se realizó a partir de semillas y botones florales coleccionados de distintas poblaciones de *L. nervosus* (secc. *Notolathyrus*), provenientes de diferentes localidades del área de distribución de la especie (Tabla 7). El número de colección, la procedencia y los códigos de los mismos se detallan en la Tabla 1.

Tabla 7. Lista de las poblaciones de *Lathyrus nervosus* analizadas, su procedencia, el tipo de análisis realizado y el número de individuos con diferentes números cromosómicos hallados en cada una de las poblaciones estudiadas. **C:** cariotipo, **M:** meiosis, **VP:** viabilidad del polen, **N:** número de individuos analizados. En la Tabla 1 se detalla los datos completos de los coleccionistas, la procedencia y las coordenadas geográficas de cada población.

Código	Análisis	Nivel de ploidía (N)		
		2x	3x	4x
49	C	20	1	1
52	C	25	-	-
56	PV	-	-	-
60	C, M, VP	30	-	-
63	C, M, VP	27	-	-

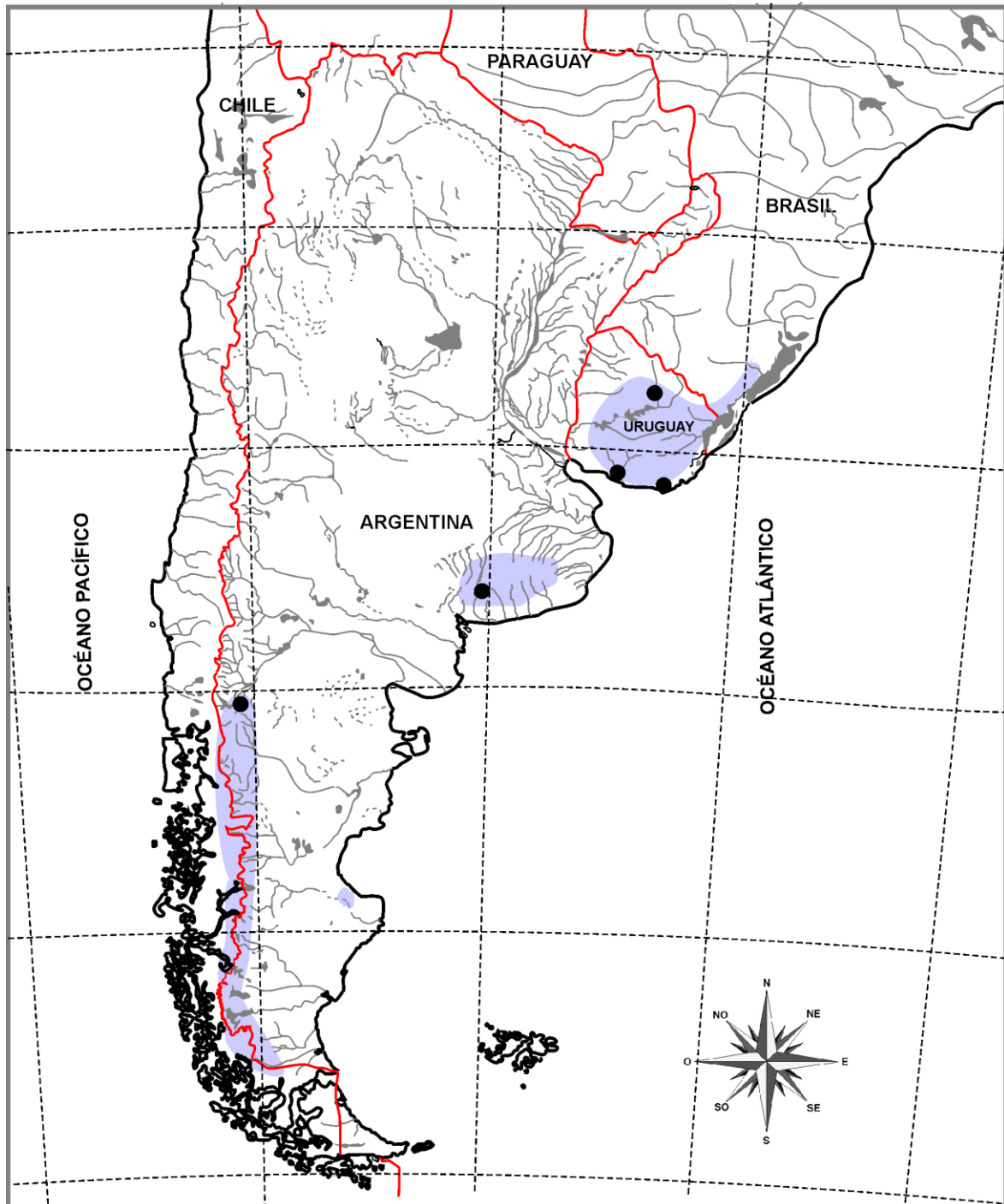


Figura 15. Distribución geográfica de *Lathyrus nervosus*. Las áreas sombreadas muestran la distribución disyunta de las poblaciones de la especie (Burkart 1935). Los puntos en negro representan las localidades de las poblaciones analizadas.

Análisis de cromosomas somáticos

La obtención de los preparados cromosómicos, el bandeo cromosómico fluorescente, la hibridación in situ fluorescente, la adquisición de imágenes digitales, la confección de los idiogramas, y los análisis estadísticos de correlación y ANOVA realizados en este Capítulo se describen en el Capítulo II. Además en este Capítulo se realizó un MANOVA aplicándose a posteriori el test de Bonferroni con el fin de determinar si existen diferencias significativas entre las poblaciones estudiadas.

Análisis meiótico

Preparaciones cromosómicas

Se utilizaron botones florales frescos o fijados en alcohol absoluto:ácido acético (3:1) por 24 h y conservados en alcohol 70 % a 4 °C. Cada una de las anteras de los botones florales seleccionados fue procesada individualmente, practicándole una incisión transversal y, mediante una leve presión ejercida con la punta de la aguja de disección, se extrajeron las células madres del polen (CMP) en una gota de orceína lactopropiónica 2 % (Dyer 1963). Las preparaciones permanentes se realizaron despegando el cubreobjetos con CO₂ (Bowen 1956) y utilizando Euparal como medio de montaje.

Análisis del comportamiento meiótico

Se examinó el comportamiento meiótico desde metafase I hasta el estadio de esporada y se registró la frecuencia de cada fenómeno observado. La clasificación de las diferentes irregularidades meióticas halladas fue realizada siguiendo el criterio de Seijo (2002).

Para poder analizar todas las fases de la meiosis fue necesario utilizar diferentes botones florales que pertenecían a diferentes inflorescencias. El índice meiótico (IM) se calculó como la proporción de esporadas normales/total de esporadas analizadas (Love 1949).

Análisis de la viabilidad del polen

Para estimar la viabilidad del polen se utilizó la técnica de tinción con carmín acético 3%:glicerina (1:1) (Pittenger y Frolik 1951). Para cada muestra se analizaron tres botones florales correspondientes a distintas inflorescencias y se contabilizaron al menos 500 granos de polen por botón. Se consideraron viables los granos que presentaron el citoplasma uniformemente teñido y, en base a su tamaño y forma, se los clasificaron en cinco categorías: granos de polen de tamaño normal (GC), macrogranos (MaG), microgranos (MiG) granos de

polen de tamaño mediano (GCM) y granos de polen con forma anormal (GCA). Los granos de polen no viables fueron reconocidos en base a la falta de coloración en el citoplasma. Finalmente, para cada muestra analizada, la viabilidad del polen se calculó como el porcentaje promedio de granos viables/total de granos de polen analizados.

RESULTADOS

Recuentos cromosómicos y análisis cariotípico

El recuento cromosómico mostró que todos los individuos de tres de las cuatro poblaciones de *L. nervosus* analizadas (52, 60 y 63) fueron diploides con $2n = 2x = 14$ (Fig. 16-18). En la población 49 se encontró, además de 20 individuos diploides, un individuo triploide ($2n = 3x = 21$, Fig. 17 C, D) y otro tetraploide ($2n = 4x = 28$, Fig. 17 E, F).

La fórmula cariotípica hallada en todo el material diploide de *L. nervosus* fue $12\ sm + 2\ st$. El tamaño cromosómico varió de 7,54 a 11,38 μm (Tabla 8). Las constricciones secundarias se observaron en un sólo par cromosómico, las que delimitaron macrosatélites. El complemento cromosómico haploide más largo correspondió a la población 63 (68,10 μm), mientras que el más corto a la población 52 (58,32 μm). Las características cariotípicas generales se resumen en la Tabla 8, las metafases representativas se muestran en las Figuras 16 y 17 y los idiogramas consensos para cada población se ilustran en la Figura 18. Los complementos de cromosomas adicionales encontrados en las plantas poliploides tuvieron la misma morfología que aquellos cromosomas observados en los complementos de las plantas diploides, por lo que las homologías se pudieron establecer con precisión. Las metafases representativas de las plantas poliploides se ilustran en la Figura 17 C-F.

El bandeo cromosómico fluorescente reveló dos tipos de heterocromatina constitutiva $\text{CMA}^+/\text{DAPI}^0$ (en adelante CMA^+) y $\text{CMA}^0/\text{DAPI}^+$ (en adelante DAPI^+) en todos los individuos analizados (Fig. 16). La heterocromatina CMA^+ se presenta en una banda única adyacente o en la misma posición que la constricción secundaria del par 7 de todas las poblaciones de *L. nervosus* analizadas. La cantidad total de este tipo de heterocromatina varió desde 0,66 a 0,75 % de la longitud total del complemento haploide.

Los patrones de heterocromatina DAPI^+ variaron en número, tamaño y localización de las bandas entre las poblaciones. Las bandas centroméricas fueron observadas en todos los cromosomas de la población 60 y en todos los cromosomas (excepto en el par 3) de las

poblaciones 52 y 63. Sin embargo, en la población 49 sólo se observaron bandas centroméricas en los pares 1, 2 y 7 (Tabla 8, Fig. 16 y 18).

Los individuos de las poblaciones 49, 52 y 63 compartieron una banda heterocromática proximal situada en los brazos cortos del par cromosómico 3. Además, en la población 63 se observaron bandas proximales en los brazos cortos de los pares cromosómicos 1 y 2 y en el brazo largo del par 1. La población 60 presentó estas bandas en los brazos cortos de los pares 4, 5 y 6 y en los brazos largos del par 1. En los brazos largos, las bandas proximales fueron observadas sólo en el par 1 de las poblaciones 60 y 63. Por otra parte, las bandas intersticiales fueron las menos frecuente, habiéndose observado solamente en los brazos largos del par cromosómico 7 de las poblaciones 49 y 63. Las bandas intersticiales del par 7 fueron cercanas a la constricción secundaria (Tabla 8, Fig. 16 y 18).

La cantidad total de heterocromatina DAPI⁺ comprendió desde 3,16 a 8,47 % de la longitud total del complemento cromosómico haploide. En general, la mayor cantidad de heterocromatina fue observada en las poblaciones que portan el mayor número de bandas heterocromáticas excepto en la población 63, en la cual a pesar de tener un gran número de bandas heterocromáticas, la mayoría de ellas fueron muy pequeñas (Tabla 8, Fig. 16 y 18). La cantidad total de heterocromatina DAPI⁺ no mostró una relación directa con la longitud total del complemento ($r = 0,35$; $p = 0,02$).

El conjunto de marcadores cromosómicos analizados permitió distinguir cada uno de los cromosomas del complemento y establecer homologías de manera precisa.

Los patrones de distribución y tamaño de los *loci* ADNr revelados por FISH fueron altamente conservados entre las poblaciones analizadas. Los genes de ADNr 45S se localizaron en los brazos largos del par cromosómico 7, mientras que los genes de ADNr 5S se observaron en los brazos cortos del par cromosómico 3 en todas las poblaciones analizadas. La posición del *locus* ADNr 45S fue distal en las poblaciones 52 y 60, mientras que en las poblaciones 49 y 63 fue intersticial. En estas dos últimas poblaciones la posición de los *loci* estuvo muy cercana al límite entre intersticial y distal.

Los complementos extras en los individuos 3x y 4x de la población 49 mostraron características de bandeo y patrones de *loci* ribosomales idénticos a aquellos observados en los complementos de los individuos diploides de la misma población (Fig. 17 C, F). El número de *loci* de ambas familias de genes ribosomales fue también determinado en los núcleos interfásicos (Fig. 17 D, E).

El análisis multivariado de la varianza (MANOVA) llevado a cabo teniendo en cuenta las variables cariotípicas (LTCH, IC, cantidad absoluta de heterocromatina DAPI⁺, cantidad absoluta de heterocromatina CMA⁺) mostró diferencias significativas entre las poblaciones analizadas ($k = 0,04$, $F = 7,10$, $p < 0,0001$). El análisis de Bonferroni mostró diferencias significativas para todas las poblaciones, excepto entre las poblaciones 60 y 63 (Tabla 8). El análisis de la varianza (ANOVA) y el test de Tukey de los parámetros individuales indicaron que éstas fueron significativamente diferentes para todas las variables analizadas, excepto para el índice centromérico promedio y para la cantidad de heterocromatina CMA⁺ (Tabla 8).

Tabla 8. Características cariotípicas de las poblaciones de *Lathyrus nervosus*. Población (**Pob**), Longitud total del complemento haploide (**LTCH**), Longitud cromosómica promedio (**LC**), rango de la longitud cromosómica (**Rango**). Los valores de estos parámetros corresponden a los promedios expresados en micrómetros y la desviación estándar se encuentra entre paréntesis. **IC**: Índice centromérico promedio. Las cantidades de heterocromatina **CMA⁺/DAPI⁰** y **CMA⁰/DAPI⁺** y la heterocromatina total (**HT**) están expresadas como valores absolutos promedios en micrómetros y entre paréntesis se encuentra el porcentaje en relación con la longitud del complemento haploide. El número de bandas heterocromáticas está indicado por complemento haploide y la localización de las mismas se detalla entre paréntesis. **p**: brazo corto. **q**: brazo largo. Las letras mayúsculas indican diferencias significativas entre las poblaciones en el análisis de MANOVA. Las letras minúsculas en supra-índice indican diferencias significativas en los valores promedio de cada parámetro (test de Tukey, 5 %), en el análisis de Bonferroni. Los códigos de las poblaciones se listan en la Tabla 1.

Pob	LTCH\pm S	LC\pm S	Rango	IC	CMA⁺ /DAPI⁰	CMA⁰/ DAPI⁺	Bandas centroméricas	Bandas proximales	Bandas intersticiales	N° de bandas	HT	MANOVA
49	65,19 ^b \pm 2,96	9,31 ^b \pm 0,95	8,41- 10,91	30,66 ^a	0,43 ^a (0,66 %)	2,06 ^a (3,16 %)	3 (1, 2, 7)	1 (3 p)	1 (7 q)	5	5,05 ^a	B
52	58,32 ^a \pm 5,00	8,33 ^a \pm 0,79	7,80- 9,47	31,57 ^a	0,44 ^a (0,75 %)	5,10 ^{bc} (8,74%)	6 (1, 2, 4, 5, 6, 7)	1 (3 p)	-	7	9,41 ^{bc}	A
60	63,29 ^{ab} \pm 6,01	9,04 ^{ab} \pm 0,98	7,54- 10,54	31,24 ^a	0,42 ^a (0,66 %)	5,40 ^c (8,53 %)	7	4 (1 q; 4, 5, 6 p)	1 (7 q)	12	11,66 ^c	C
63	68,10 ^b \pm 3,01	9,73 ^b \pm 0,92	8,64- 11,38	30,36 ^a	0,46 ^a (0,67 %)	3,78 ^b (5,55 %)	6 (1, 2, 4, 5, 6, 7)	4 (1 q; 1, 2, 3 p)		11	6,68 ^b	C
ANOVA	F= 8,13 p= 0,0016	F= 8,13 p= 0,0016		F= 0,93 p= 0,4487	F= 0,57 p= 0,6427	F= 17,51 p < 0,0001					F= 17,51 p < 0,0001	λ = 0,04 F= 7,10 p < 0,0001

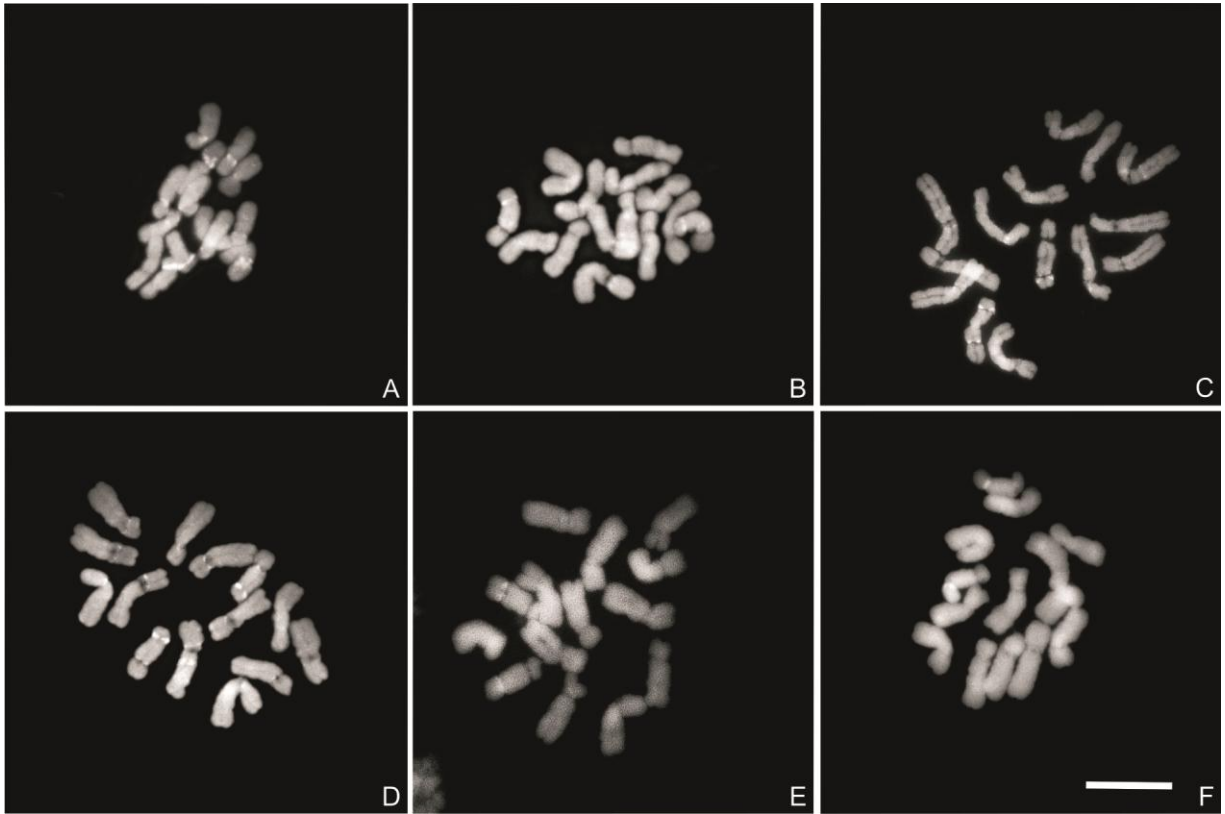


Figura 16. Metafasas de individuos de diferentes poblaciones de *Lathyrus nervosus* con bandeo CMA-DAPI. **A-D:** muestran heterocromatina CMA⁰/DAPI⁺ y **E-F:** muestran heterocromatina CMA⁺/DAPI⁰. **A:** población 52, **B:** población 49, **C:** población 60, **D:** población 63, **E:** población 60 y **F:** población 63. Los códigos de las poblaciones se listan en la Tabla 1. Barra = 10 μ m.

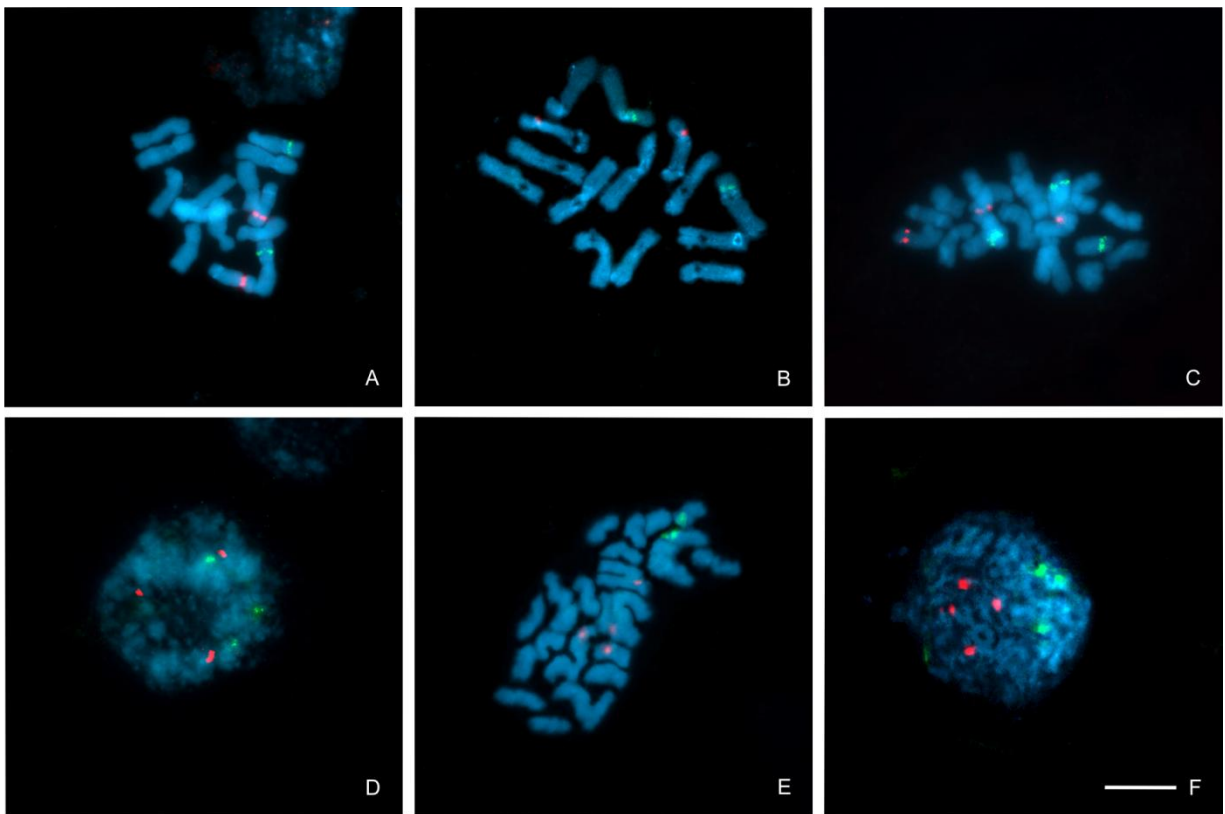


Figura 17. Doble hibridación *in situ* fluorescente con sondas ribosomales de individuos de distintas poblaciones de *Lathyrus nervosus* en metafases (A-C y E) e interfases (D y F). Sobre los cromosomas, las señales fluorescentes en verde (FICT) corresponden a los sitios de hibridación de la sonda para los genes ADNr 5S y en rojo (TRICT) a los sitios de hibridación de la sonda para los genes ADNr 45S. La contratinción con DAPI (azul claro), después del procedimiento de FISH se utiliza para resaltar las bandas heterocromáticas y para teñir la eucromatina. **A:** población 52, **B:** población 60, **C-D:** individuo triploide de la población 49, **E-F:** individuo tetraploide de la población 49. El núcleo interfásico del individuo 3x (**D**) muestra tres señales y el núcleo del individuo 4x (**F**) muestra 4 señales para cada una de las familias de genes ribosomales. Los códigos de las poblaciones se listan en la Tabla 7. Barra = 10 μ m.

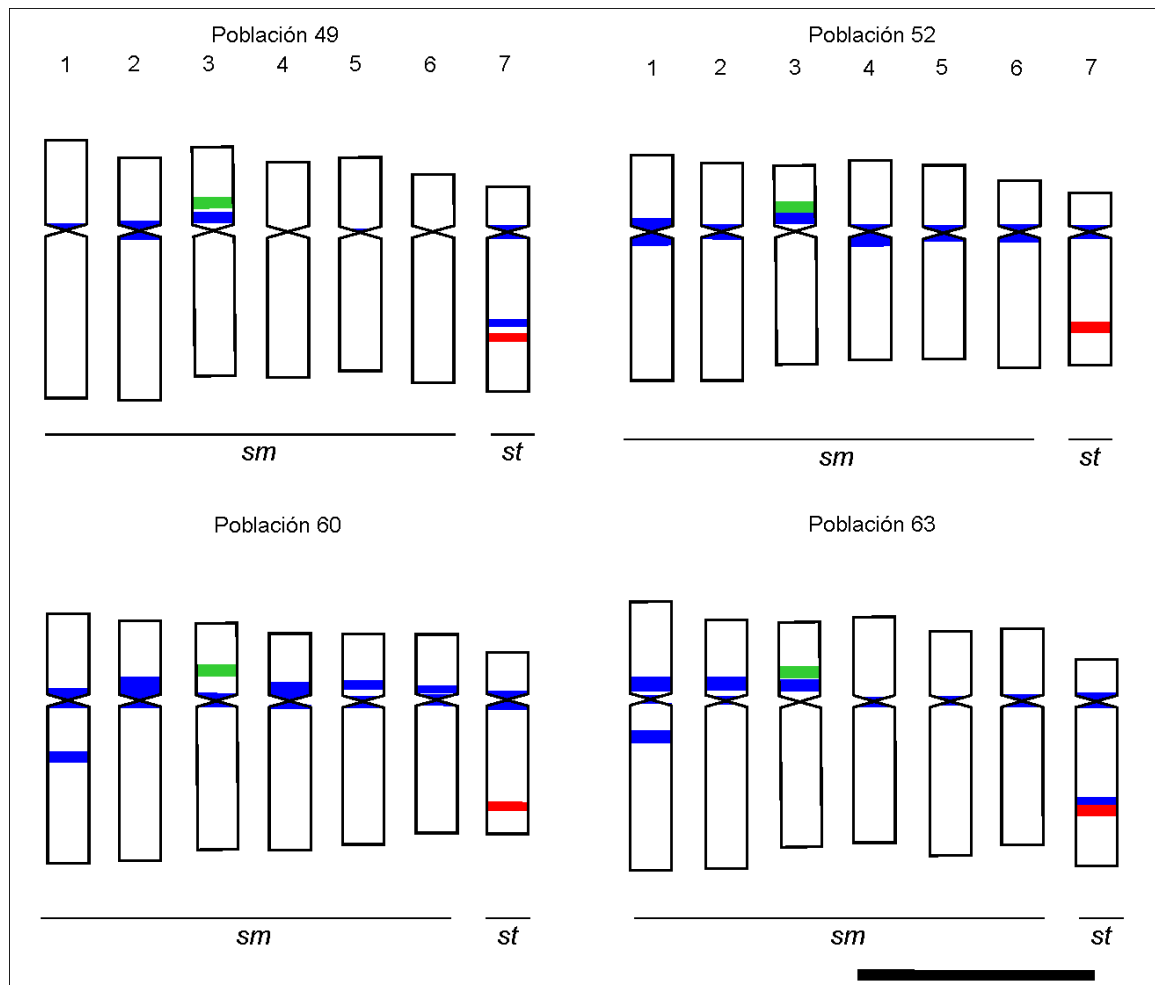


Figura 18. Idiogramas de las poblaciones estudiadas de *Lathyrus nervosus*. En rojo se representan los *loci* de ADNr 45S, en verde los de 5S ADNr y en celeste las bandas heterocromáticas DAPI⁺. Los códigos de las poblaciones se listan en la Tabla 7. Barra = 10 µm.

Comportamiento meiótico y análisis de la viabilidad de polen

El análisis del comportamiento meiótico reveló la ocurrencia de irregularidades en la mayoría de las fases de las dos poblaciones estudiadas (60 y 63) (Tabla 9, Fig. 19). En ambas poblaciones, las anomalías más frecuentes fueron la presencia de uno o dos bivalentes fuera de placa en metafase I (Fig. 19 A) y de uno a tres cromosomas rezagados en anafase I. En la población 60, también se observaron puentes cromatínicos con y sin fragmentos (Fig. 19 B). En telofase I se registraron cromosomas fuera de núcleos (Fig. 19 C) y la presencia de dos a tres micronúcleos.

En la segunda profase se encontraron fragmentos o puentes con fragmentos en la población 60 y micronúcleos en la población 63. Durante la metafase II, la configuración anormal más frecuente, en ambas poblaciones, fue la presencia de cromosomas fuera de placa (Fig. 19 D). También se observaron puentes sin fragmento. En telofase II se registraron, en ambas poblaciones, de 1 a 7 micronúcleos en adición a los cuatro núcleos de tamaño aproximadamente normal (Fig. 19 E, F). Además, se observaron puentes con y sin fragmento y núcleos no reducidos.

Los índices meióticos calculados a partir del análisis de esporadas fueron 60,56 en la población 60 y 90,5 en la población 63 (Tabla 10). En el análisis de las esporadas, el fenómeno más frecuente fue la presencia de tétradas con 1 a 4 microcitos. De acuerdo al tamaño nuclear y a las características cromatínicas se distinguieron dos tipos principales de microcitos: 1) aquellos conformados por una única cromátida (de menor tamaño) y 2) aquellos constituidos por dos cromátidas (de mayor tamaño).

Otro tipo de anomalía frecuente en las esporadas fue la presencia de núcleos no reducidos observados en díadas (1,17 - 2 %; Fig. 19 G), tríadas (3,75 %; Fig. 19 H) y mónadas (4,22 %). De acuerdo al número de microsporas no reducidas observadas, el porcentaje de gametos no reducidos esperado fue de aproximadamente 1,6 % de polen $2n$ y 1 % de polen $4n$.

El análisis de polen reveló diferencias significativas en la viabilidad (82,22 - 98,07) entre las tres poblaciones analizadas (56, 60 y 63). La reducción diferencial de viabilidad fue debido principalmente a la presencia de polen no teñido (1,93 - 17,78 %), microgranos (0,72 - 1,21 %), macrogranos (0,13 - 0,95 %), granos teñidos anormalmente (0 - 0,4 %) y granos teñidos de tamaño mediano (0 - 1,92 %) (Tabla 11, Fig. 20).

Tabla 9. Análisis meiótico en poblaciones de *Lathyrus nervosus* (60 y 63). **n:** número de células analizadas y **%:** porcentaje de células normales y portadoras de cada anomalía con respecto al número de células analizadas en cada fase. Los códigos de las poblaciones se listan en la Tabla 7.

Fases	Configuraciones	60		63	
		n	%	n	%
MI	Normal	48	90,57	162	94,19
	Bivalentes fuera de placa (1-2)	5	9,43	10	5,81
AI	Normal	168	89,84	66	92,96
	Puentes con fragmento	1	0,53	-	-
	Puentes sin fragmento	1	0,53	-	-
	Cromosomas rezagados (1-3)	17	9,09	5	7,04
TI	Normal	19	86,36	27	96,55
	Cromosomas fuera de núcleos	1	4,54	-	-
	Micronúcleos (2-3)	2	9,09	1	3,45
PII	Normal	134	97,10	-	-
	Fragmentos	3	2,17	-	-
	Puente con fragmento	1	0,72	-	-
	Micronúcleos	-	-	2	100
MII	Normal	165	96,49	238	95,58
	Fragmentos	2	1,16	-	-
	Cromosomas fuera de placas	3	1,75	11	4,42
	Puente sin fragmento	1	0,58	-	-
AII	Normal	-	-	24	100
TII	Normal	810	92,88	559	95,88
	Dos núcleos no reducidos	1	0,11	-	-
	Dos núcleos reducidos con uno no reducido	1	0,11	4	0,68
	Micronúcleos (1-7)	44	5,04	17	2,91
	Fragmentos	5	0,57	-	-
	Puente sin fragmentos	10	1,15	2	0,34
	Dos puentes con fragmentos	1	0,11	1	0,17

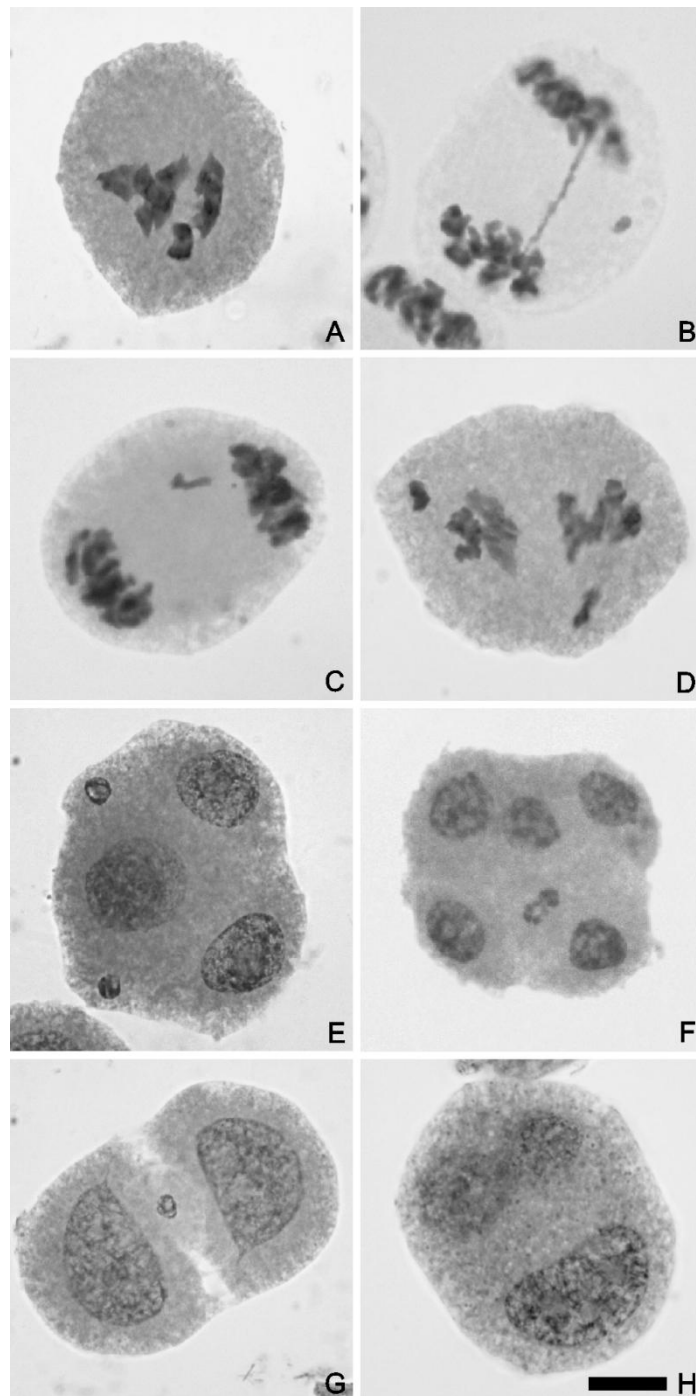


Figura 19. Células en división meiótica de la población 60. **A:** metafase I con un bivalente fuera de placa, **B:** ana-telofase I con un puente y un fragmento, **C:** ana-telofase I con una cromátida fuera de núcleo, **D:** metafase II con dos cromosomas fuera de placa, **E:** telofase II con dos micronúcleos, **F:** telofase II con cinco núcleos y un cromosoma bicromatídico fuera de núcleo, **G:** CMP inmediatamente después de la citocinesis con dos núcleos no reducidos y un microcito, **H:** CMP en citocinesis con un núcleo no reducido y dos núcleos reducidos. Barra=10 μ m.

Tabla 10. Tipos de esporadas observadas e índice meiótico (**IM**) de dos poblaciones de *Lathyrus nervosus*. **n**: número de células analizadas y **%**: porcentaje de células portadoras de cada anomalía con respecto al número de células analizadas en cada fase. Los códigos de las poblaciones se listan en la Tabla 7.

Tipos de esporadas	Población 60		Población 63	
	n	%	n	%
Tétradas normales	258	60,56	247	90,50
Tétradas con 1-4 microcitos	129	30,28	24	8,79
Díadas	5	1,17	2	0,73
Tríadas	16	3,75	-	-
Mónadas	18	4,22	-	-
Total	426	100	273	100
IM		60,56		90,50

Tabla 11. Análisis del polen en diferentes poblaciones de *Lathyrus nervosus*. Los valores están expresados en porcentajes del total de granos analizados. **GC**: Granos coloreados de tamaño normal, **GNC**: granos de polen no coloreados, **MiG**: microgranos, **MaG**: macrogranos, **GCA**: granos de polen coloreados anormales, **GCM**: granos de polen coloreados de tamaño mediano. La viabilidad fue estimada a partir de los granos coloreados. Los códigos de las poblaciones se listan en la Tabla 7.

Poblaciones	GC	GNC	MiG	MaG	GCA	GCM	Viabilidad
56	96,46	1,93	1,21	0,24	0,00	0,16	98,07
60	79,20	17,78	0,84	0,13	0,13	1,92	82,22
63	95,46	2,47	0,72	0,95	0,40	0,00	97,53

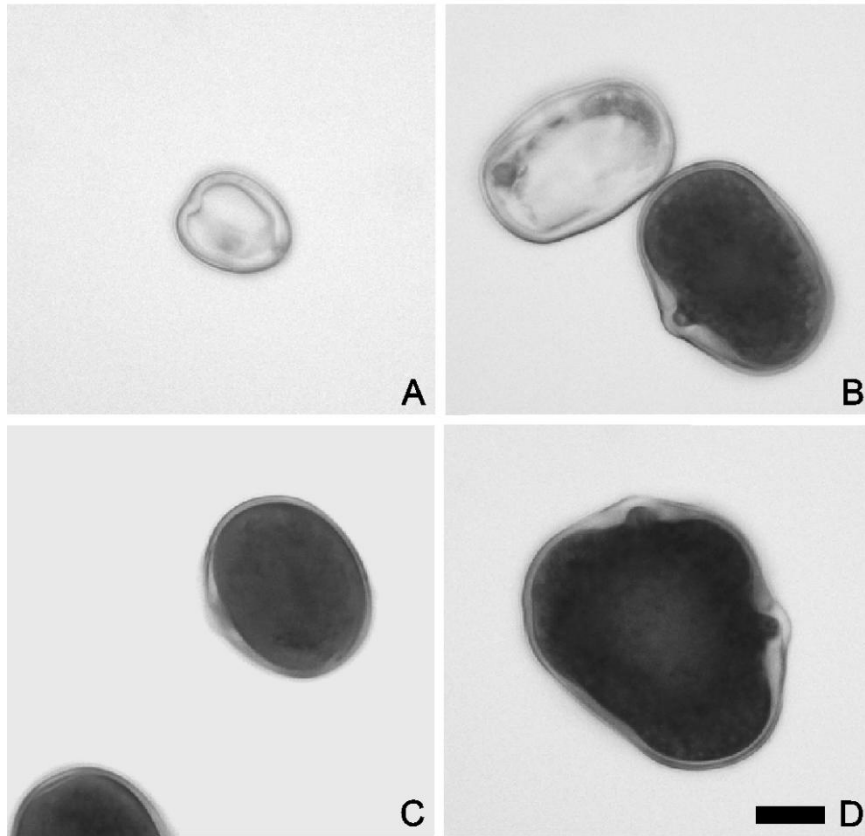


Figura 20. Granos de polen de la población 60 de *Lathyrus nervosus*. **A:** Micrograno (MiG), **B:** granos de polen coloreado (GC) y no coloreado (GNC), **C:** grano de polen coloreado de tamaño mediano (GCM), **D:** macrograno (MaG). Barra= 10 μ m.

DISCUSIÓN

Características generales del cariotipo

La fórmula cariotípica $12\text{ sm} + 2\text{ st}$ encontrada en todas las poblaciones de *Lathyrus nervosus* fue levemente diferente a la encontrada en análisis previos utilizando tinción de Feulgen [$2\text{ m} + 10\text{ sm} + 2\text{ st}$ (Seijo y Fernández 2003), $2\text{ m} + 12\text{ sm}$ (Battistin y Fernández 1994; Klamt y Schifino-Wittmann 2000)]. Estas diferencias podrían deberse a pequeños cambios en la morfología cromosómica causados por la técnica empleada (Schwarzacher y Heslop-Harrison 2000), ya que los cambios en las categorías morfológicas de los cromosomas después de la hibridación *in situ* fluorescente son particularmente frecuentes cuando los índices centroméricos se encuentran cerca de los valores que determinan el límite de cada categoría en la nomenclatura de Levan *et al.* (1964), como es el caso de algunos pares cromosómicos de *L. nervosus*. A pesar de estas pequeñas diferencias con otros autores, los resultados aquí obtenidos reflejan una fórmula cariotípica constante entre las cuatro poblaciones de *L. nervosus* analizadas y sustentan la hipótesis que propone la existencia de una gran estabilidad morfológica de los cromosomas a nivel interpoblacional en las especies de *Lathyrus* (Murray *et al.* 1992, Seijo y Fernández 2003).

Bandeo cromosómico

El análisis de los cromosomas con bandeo fluorescente reveló que las poblaciones de *L. nervosus*, a pesar de presentar una fórmula cariotípica conservada, muestran un patrón de bandas heterocromáticas DAPI⁺ que varía en el número, en el tamaño y en la posición de las mismas. Este resultado constituye el primer registro de variación en la cantidad y distribución de heterocromatina entre poblaciones naturales de *Lathyrus*. En particular, la variación detectada en los patrones de bandas DAPI⁺ de *L. nervosus* sugiere que los cambios en la cantidad y localización de la heterocromatina rica en AT constituye uno de los mecanismos involucrados en la evolución de los cariotipos de esta especie. Sin embargo, los cambios observados en la cantidad de heterocromatina no explican totalmente la variación en la longitud del complemento entre las poblaciones, y sugieren que otros mecanismos que afectan a la fracción eucromática estarían determinando también la variación de las longitudes de los complementos entre las poblaciones analizadas, tal como se observó en el Capítulo II de esta tesis para las especies de *Notolathyrus*.

Se han propuesto varios mecanismos para explicar las amplificaciones y deleciones diferenciales de elementos repetitivos que pueden alterar tanto el tamaño de los bloques

heterocromáticos como la cantidad de eucromatina. Los más conocidos son el entrecruzamiento desigual (Bennett *et al.* 1977), el deslizamiento de la polimerasa y la inserción o delección masiva de elementos móviles (Loidl 1983, Schubert y Wobus 1985). Asimismo, cambios en el estado epigenético de la cromatina, por pérdidas o alteraciones de bordes y aisladores cromatínicos (Dorman *et al.* 2007) o por la inserción de *novo* de elementos móviles pueden determinar cambios en el tamaño de las bandas heterocromáticas dentro de un cariotipo (Slotkin y Martienssen 2007). Sin embargo, los cambios en la localización de las bandas heterocromáticas son más difíciles de explicar, en particular, cuando la fórmula cariotípica se mantiene constante entre los individuos que muestran diferentes patrones de distribución de la heterocromatina. La mayoría de las hipótesis, hasta ahora formuladas proponen que tales cambios posicionales pueden estar relacionados con la actividad de los elementos móviles (transposones y retrotransposones) o menos frecuentemente por entrecruzamiento desigual entre cromosomas no homólogos (Bennett *et al.*, 1977, Kumar y Bennetzen 1999). Todos estos mecanismos podrían haber participado en la diferenciación de los patrones de bandas heterocromáticas observadas entre las distintas poblaciones de *L. nervosus* aunque, con los estudios realizados, no se puede cuantificar la magnitud con que cada uno ha participado.

Mapeo de genes ribosomales

El análisis de los *loci* ribosomales estudiados mediante FISH reveló un patrón altamente conservado dentro de las poblaciones analizadas, aunque los *loci* ADNr 45S presentan leves diferencias en la posición dentro de los brazos entre las mismas. La presencia de los *loci* de ADNr 45S ubicados en la constricción secundaria de un sólo par de cromosomas y también de los *loci* de ADNr 5S ubicados en un par cromosómico distinto al 45S es consistente con el patrón observado en todas las especies de la sección *Notolathyrus* (Capítulo II).

Variación cariotípica entre las poblaciones

A pesar que la fórmula cariotípica en todas las poblaciones analizadas fue conservada, los parámetros del análisis cariotípico mostraron que las poblaciones de Bariloche (52) y de Sierra de la Ventana (49) (ambas de Argentina) fueron significativamente diferentes entre sí y diferentes de las poblaciones de Uruguay (60 y 63, que no presentaron diferencias significativas entre ellas). Las principales diferencias entre las poblaciones fueron la longitud del complemento haploide, el número de bandas y la cantidad de

heterocromatina DAPI⁺. Aunque la mayoría de las poblaciones fueron significativamente diferentes para la cantidad de heterocromatina, la variación observada en este Capítulo no pudo asociarse con ninguna variable geográfica o climática Capítulo, y por lo tanto, el significado adaptativo de la variación del contenido de heterocromatina sigue siendo poco claro.

Autopoliploides en la sección Notolathyrus

Otro de los hallazgos más destacados del análisis cariotípico realizado en *L. nervosus* es la presencia de tres citotipos diferentes dentro de una sola población. Aunque la poliploidía se considera como uno de los principales mecanismos de la evolución y la diversificación de las plantas (Soltis y Soltis 1999), para el género *Lathyrus* es un fenómeno muy raro (Senn 1938, Yamamoto *et al* 1984, Gutiérrez *et al.* 1994). El hallazgo de individuos triploides y tetraploides de *L. nervosus*, en esta tesis, constituye la primera cita de poliploidía para la sección Notolathyrus, mientras que la existencia de poliploidía impar en una población mixta con tres citotipos diferentes resulta una novedad para el género y la tribu Fabeae. La gran similitud observada en la morfología de los cromosomas, el patrón de bandas y el mapeo de los *loci* ADNr en los complementos adicionales de los individuos poliploides con los complementos de los diploides pertenecientes a la misma población evidencia que los citotipos 3x y 4x se habrían originado por autopoliploidía. Aunque los polimorfismos de citotipos (2x, 4x, 6x) a nivel interpoblacional citados para *L. palustris* y *L. pratensis* fueron considerados como casos de autopoliploidía, y de que se ha sugerido un origen alopoliploide para *L. venosus* (Khawaja *et al.* 1998), el mecanismo por el cual ocurre la poliploidización en el género todavía no ha sido estudiado (Gutiérrez *et al.* 1994). En general, se ha propuesto que los poliploides pueden formarse por duplicación de los cromosomas en células somáticas o bien por poliploidización sexual (Darlington 1965, Harlan y De Wet 1975). Mientras que el primer mecanismo usualmente requiere de un proceso de endoreduplicación, el segundo implica la formación de gametos no reducidos por restitución nuclear, fusión de polos anafásicos o fallas en la citocinesis (Darlington 1965, Harlan y De Wet 1975).

En poblaciones con distintos niveles de citotipos, la producción de gametos no reducidos es usualmente considerada como la primera evidencia que la poliploidización sexual podría suceder (Kovalsky y Solís Neffa 2012). Asimismo, la detección de granos de polen gigantes y viables ha sido considerada como una prueba directa de la producción de gametos no reducidos en varios grupos de angiospermas (Vorsa y Bingham 1979,

Bretagnolle y Thompson 1995). La detección de microsporas no reducidas $2x$ y $4x$ en las poblaciones 60 y 63, así como la observación de granos de polen no reducidos en las poblaciones 56, 60 y 63 de *L. nervosus* sugiere que la producción de gametos no reducidos es muy común en la especie y que también podría estar ocurriendo en la población 49 donde se encontraron los individuos poliploides. Este hecho sustenta a la poliploidización sexual como el mecanismo más probable para explicar el origen de los citotipos $3x$ y $4x$ en la población 49 de *L. nervosus*.

Para explicar la poliploidización sexual se han propuesto dos mecanismos. Uno de ellos, es la poliploidización sexual unilateral. Partiendo de un individuo $2x$, esta ruta genera un citotipo impar como resultado de la unión de un gameto reducido con otro no reducido. El otro es la poliploidización sexual bilateral, que implica la fusión de gametos femeninos y masculinos no reducidos generando así, individuos poliploides pares (Harlan y De Wet 1975). De acuerdo con estos mecanismos, el individuo triploide encontrado en la población 49 de *L. nervosus* podría haberse originado por poliploidización sexual unilateral, mientras que el tetraploide podría haberse originado por poliploidización sexual bilateral o unilateral utilizando a los triploides como puentes.

Análisis de la microsporogénesis

Las poblaciones de *L. nervosus* analizadas revelaron diferentes irregularidades en el comportamiento meiótico que podrían haber conducido a la formación de granos de polen aneuploides y también de granos de polen no reducidos. Se ha propuesto que las principales causas de la producción de los microgranos de polen son los cromosomas que quedan excluidos de los núcleos, ya sea por orientación o segregación anómala de un bivalente en metafase I o por errores en la segregación de bivalentes con orientación regular (Defani-Scoarize *et al.* 1995, Risso-Pascotto *et al.* 2006, Seijo y Solís Neffa 2006). En *L. nervosus*, luego de la segregación de los bivalentes, los cromosomas bicromatídicos rezagados pueden o no segregar en anafase I y anafase II. Estos cromosomas pueden formar luego, en telofase II, micronúcleos con una o dos cromátidas. Después de la citocinesis, en la fase de esporada, estos micronúcleos son usualmente observados como micronúcleos dentro de microcitos, que en última instancia podrían diferenciarse en microgranos de polen. Por otro lado, los núcleos aneuploides que resultaron de la pérdida de cromosomas que quedaron fuera de placa, probablemente aborten durante la diferenciación del polen, dando lugar a los granos de polen no teñidos. Si algún grano de polen aneuploide ocasionalmente fertilizara un óvulo, el embrión formado sería inviable y

no produciría semillas maduras. Esta afirmación es concordante con el hecho de que no se han encontrado individuos aneuploides en ninguna de las poblaciones analizadas en este estudio.

Por otra parte, desde un punto de vista citológico, la producción de gametos $2n$ está generalmente asociada con la formación de núcleos de restitución tanto en la primera como en la segunda división meiótica. Sin embargo, los mecanismos que llevan a formación de estos núcleos de restitución son diversos y van desde los puentes cromatínicos persistentes, como ocurre en algunas especies de *Arachis* (Lavia *et al.* 2011) y *Begonia* (Dewitte *et al.* 2010), hasta fallas en la formación de los husos, como ocurre en muchas angiospermas (Bretagnolle y Thompson 1995). El análisis meiótico realizado en *L. nervosus* evidenció la presencia de puentes remanentes, algunos de ellos hasta telofase II. Este fenómeno podría haber llevado a la formación de núcleos de restitución tanto en la primera como en la segunda división. La ocurrencia de restitución nuclear en la primera división meiótica sin una división posterior, podría explicar el origen de las mónadas observadas en la población 60. Por otra parte, la restitución nuclear en primera división seguida por una división similar a una mitosis, explicaría el origen de las díadas, tal como las que se registraron en las poblaciones 60 y 63. Se ha propuesto que las tríadas se originarían por núcleos de restitución o fusión de polos en la segunda división (Bretagnolle y Thompson 1995, Lim *et al.* 2001). Para el caso particular de *Lathyrus nervosus*, la presencia de puentes cromatínicos remanentes en telofase II sugiere que la causa más probable responsable de la formación de triadas sería la fusión de polos.

CAPÍTULO IV
FILOGENIA DE LA SECCIÓN
NOTOLATHYRUS

INTRODUCCIÓN

El principal problema en la taxonomía de *Lathyrus* (Barneby y Reveal 1971, Kupicha 1983), en concordancia con los demás géneros de la tribu Fabeae (Gunn y Kluge 1976, Kupicha 1981, Steele y Wojciechowski 2003), ha sido la utilización de caracteres morfológicos que generalmente resultan homoplásicos. En la búsqueda de caracteres diagnósticos más informativos para la clasificación infragenérica de *Lathyrus*, se utilizaron marcadores moleculares (Asmussen y Liston 1998, Croft *et al.* 1999, Chtourou-Ghorbel *et al.* 2001, Badr *et al.* 2002, Ben Brahim *et al.* 2002) o secuencias de ADNn y ADNcp (Kenicer *et al.* 2005). Sin embargo, la mayoría de estos trabajos presentan un limitado alcance geográfico y taxonómico, centralizándose únicamente en taxones del Mediterráneo y en particular en especies de la sección *Lathyrus*. Los únicos trabajos que incluyen una muestra representativa de todo el género son los de Asmussen y Liston (1998) y Kenicer *et al.* (2005), aunque sólo analizaron cuatro y cinco especies sudamericanas, respectivamente.

Los resultados del estudio realizado por Asmussen y Liston (1998) utilizando datos de RFLP en ADNcp concuerdan en gran parte con la organización de las secciones propuesta por Kupicha (1983), aunque sugieren fusionar algunos grupos. Estos autores presentan evidencias de que la sección *Orobus* sólo es monofilética cuando incorporan a las especies sudamericanas (Fig. 21). En función de esto, proponen que la sección *Notolathyrus* debería sinonimizarse a la sección *Orobus*.

En contraste con lo propuesto por Asmussen y Liston (1998), el análisis filogenético realizado por Kenicer *et al.* (2005), utilizando secuencias nucleares y cloroplásticas, sugiere que las especies sudamericanas constituyen un grupo particular y diferente de *Orobus* según lo observado en uno de los árboles más parsimoniosos. Si bien, las especies

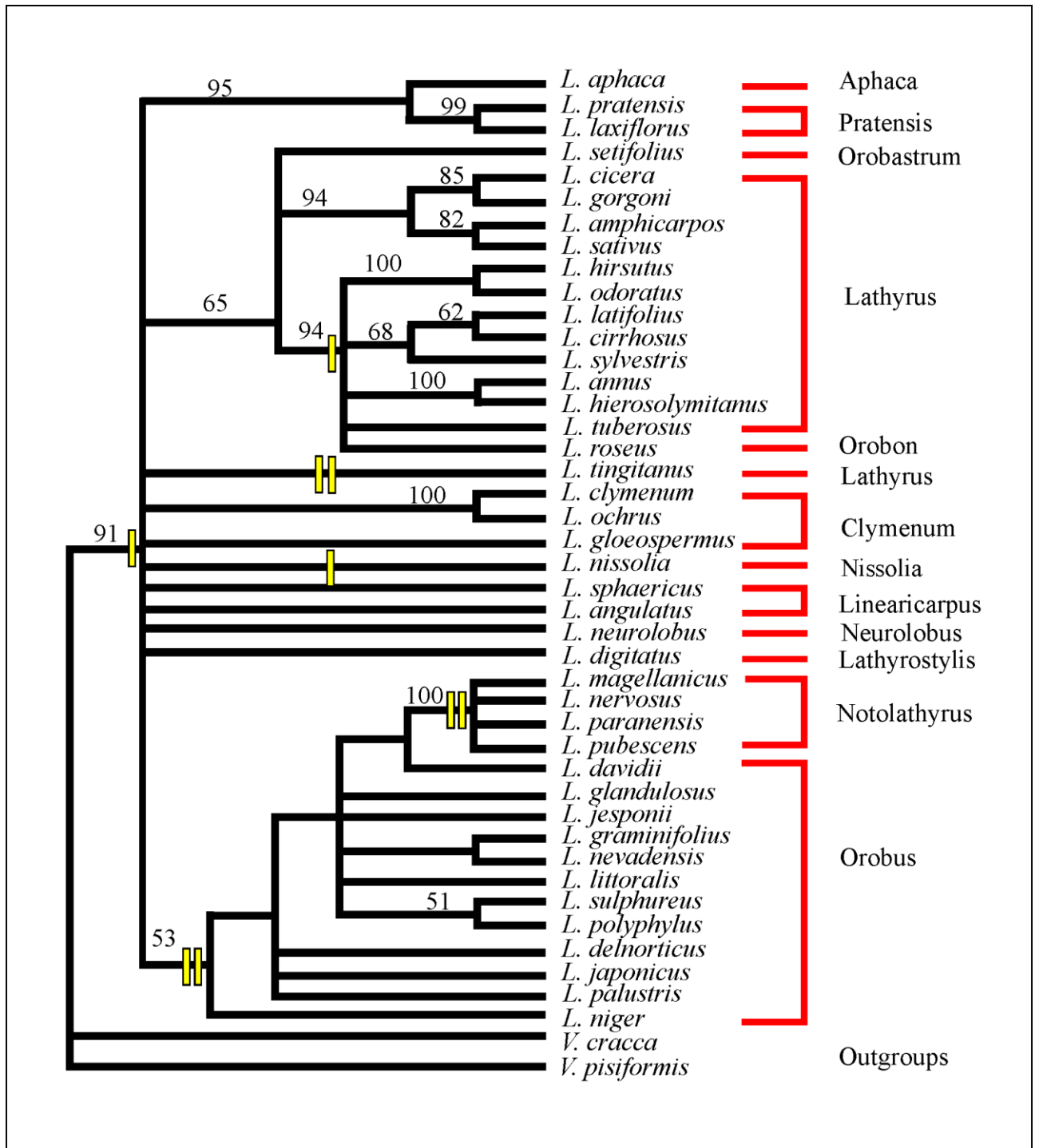


Figura 21. Árbol de consenso estricto resultado del análisis de parsimonia a partir de una matriz de datos combinada de las regiones cloroplásticas rpoC e IR de *Lathyrus*. Las barras amarillas sobre las ramas del árbol indican inserciones y deleciones. Los números representan el soporte del árbol. A la derecha se marcan las secciones según Kupicha (1983). Extraído y modificado de Asmussen y Liston (1998).

sudamericanas aparecen en una politomía junto con algunos grupos de la sección *Orobus* y miembros de las secciones *Aphaca* y *Lathyrostylis* en el árbol consenso, los autores sugieren que la sección *Notolathyrus* presentaría mayor afinidad con las especies del Mediterráneo que con las especies de *Orobus* de Norteamérica (Fig. 22).

A nivel intraseccional, la relación entre las especies sudamericanas es desconocida y los límites entre los taxones muchas veces son difíciles de establecer. La identificación de las 23 especies de *Notolathyrus* actualmente se realiza utilizando caracteres morfológicos tales como: el número de flores por inflorescencia, la relación largo y ancho de los folíolos, la presencia y el ancho de las alas en los tallos, el color y la pubescencia de los frutos, la presencia de septos interseminales en las vainas, y el color y la forma de las semillas (Burkart 1935, 1942, Rossow 1982). Sin embargo, en general, no existen características diagnósticas únicas y la identificación de los ejemplares se realiza utilizando la sumatoria de estos caracteres. Más aún, muchos de los caracteres morfológicos utilizados son de distribución continua, y los rangos para separar a las especies, en muchos casos, se solapan.

Por lo tanto, la ausencia de caracteres morfológicos diagnósticos en la sección *Notolathyrus* ha dificultado, hasta el momento, la identificación de las especies del grupo así como el establecimiento de las relaciones evolutivas tanto dentro de la sección *Notolathyrus* como de ésta en el contexto del género. En este Capítulo se analizan 18 especies de la sección *Notolathyrus* utilizando regiones de ADNn (ITS1-ITS2 más la región codificadora 5,8S) y de ADNcp (trnS-trnG) con los siguientes objetivos:

Objetivo General

Inferir las relaciones filogenéticas existentes entre las especies sudamericanas y aportar datos sobre su probable origen.

Hipótesis

- 1- La sección *Notolathyrus* es monofilética.
- 2- Las especies morfológicamente semejantes y con áreas de distribución similares se encuentran más relacionadas filogenéticamente.

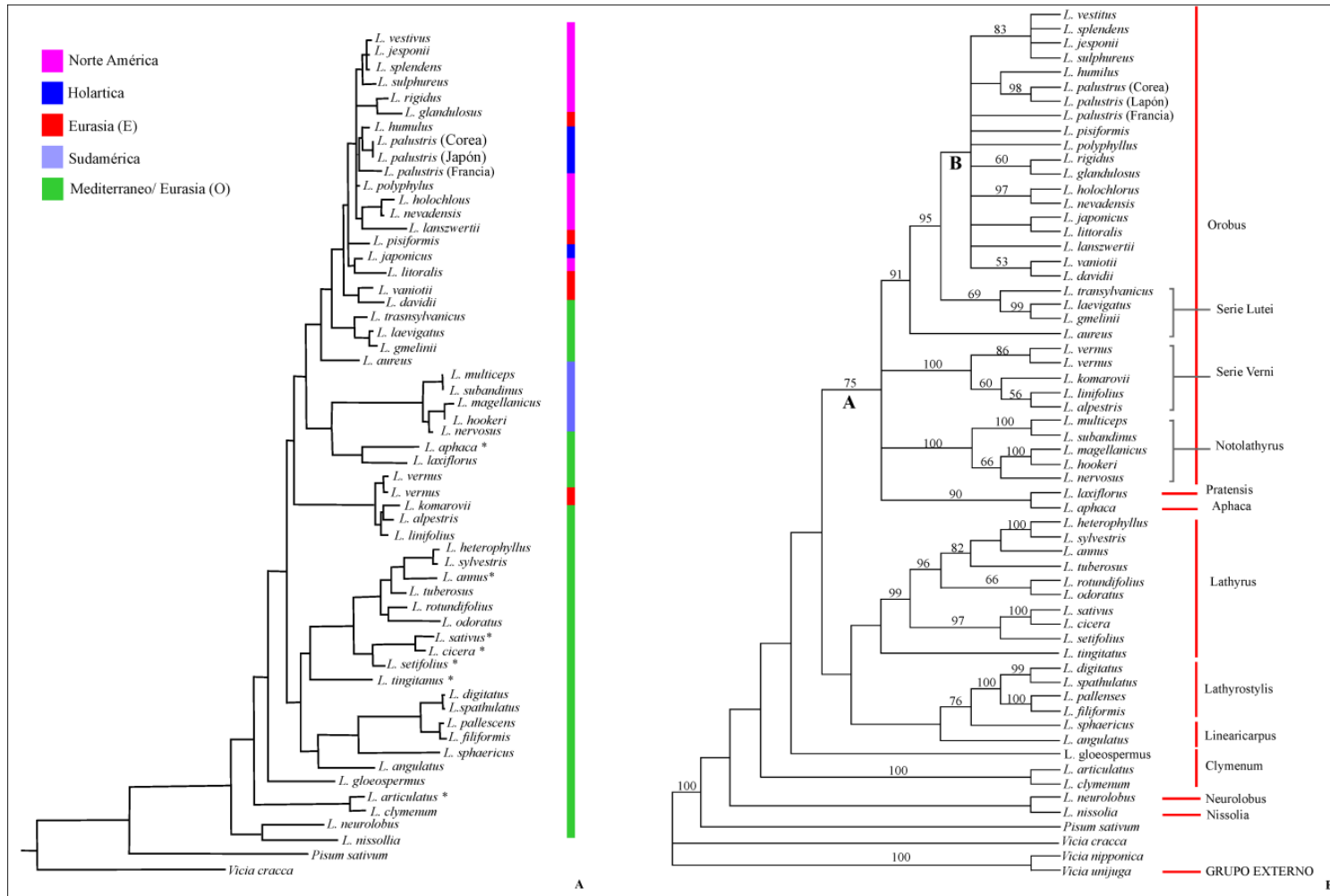


Figura 22. Árboles filogenéticos de *Lathyrus* publicados por Kenicer *et al.* (2005). **A:** Uno de los árboles más parsimoniosos, **B:** Árbol de consenso estricto. Las barras verticales hacen referencia a la distribución geográfica de las especies. Los asteriscos corresponden a las especies anuales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los análisis filogenéticos se llevaron a cabo a partir de secuencias de ADNcp y de ADNn de 17 (73,91 %) y 14 especies (60,87%) de la sección *Notolathyrus*, respectivamente (Tabla 12). Para el caso de *L. magellanicus* se analizaron tres de las cinco variedades reconocidas. Si bien se trató de incluir la mayor cantidad de especies sudamericanas posibles, algunas de ellas no pudieron ser localizadas en la naturaleza. Cabe mencionar que algunas de estas especies se conocen sólo de la localidad tipo o bien de muy pocas localidades, las que se encuentran frecuentemente afectadas por la agricultura o la ganadería. Para subsanar este inconveniente se intentó realizar amplificaciones de ADN a partir de material de herbario, sin embargo, en muchos casos las colecciones fueron muy antiguas y no se pudieron obtener amplificaciones satisfactorias. La lista de taxones analizados con sus códigos se muestra en la Tabla 12 los detalles de colección y procedencia en la Tabla 1 (Capítulo 1).

En los estudios realizados se incluyeron secuencias de especies de otras secciones como grupos externos. Estas secuencias fueron tomadas de la base de datos pública disponible en la dirección www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank. Los códigos de identificación de las secuencias para cada especie se detallan en la Tabla 13.

Tabla 12. Listado de especies utilizadas en los distintos análisis filogenéticos. La columna de la derecha muestra cuales fueron los marcadores utilizados.

<i>Lathyrus</i>	Código	Marcador analizado
Secc. Notolathyrus		
<i>L. cabrerianus</i>	1	trnS-trnG/ ITS
<i>L. crassipes</i>	2	trnS-trnG/ITS
<i>L. hasslerianus</i>	12	trnS-trnG/ITS
<i>L. linearifolius</i>	14	trnS-trnG
<i>L. macropus</i>	23	trnS-trnG
<i>L. macrostachys</i>	27	trnS-trnG/ITS
<i>L. magellanicus</i> var. <i>glauscegens</i>	29	trnS-trnG/ITS
<i>L. magellanicus</i> var. <i>magellanicus</i>	38	trnS-trnG/ITS

Continuación de la Tabla 12.

<i>Lathyrus</i>	Código	Marcador analizado
<i>L. magellanicus</i>	39	trnS-trnG/ITS
<i>var. tucumanensis</i>		
<i>L. multiceps</i>	44	trnS-trnG/ITS
<i>L. nervosus</i>	49	trnS-trnG/ITS
<i>L. nigrivalvis</i>	58	trnS-trnG
<i>L. nitens</i>	59	trnS-trnG/ITS
<i>L. paranensis</i>	60	trnS-trnG/ITS
<i>L. parodii</i>	61	ITS
<i>L. pubescens</i>	81	trnS-trnG/ITS
<i>L. subandinus</i>	88	trnS-trnG/ITS
<i>L. subulatus</i>	93	trnS-trnG/ITS
<i>L. tomentosus</i>	97	trnS-trnG/ITS
<i>L. tropicalandinus</i>	105	trnS-trnG
Secc. Lathyrus		
<i>L. odoratus</i>	-	trnS-trnG/ITS
<i>L. sylvestris</i>	-	trnS-trnG/ITS
<i>L. tingitanus</i> L.	-	trnS-trnG/ITS
Secc. Lathyrostylis		
<i>L. filiformis</i> (Lam.) J. Gay	-	trnS-trnG/ITS
<i>L. pallences</i> (M. Bieb.) K. Koch.	-	trnS-trnG/ITS
<i>L. spathulatus</i> Celak.	-	trnS-trnG/ITS
Secc. Orobus		
<i>L. japonicus</i>	-	trnS-trnG/ITS
<i>L. jesponii</i> Greene.	-	trnS-trnG/ITS
<i>L. vernus</i> (L.) Bernh	-	trnS-trnG/ITS
Vicia		
<i>V. cracca</i>	-	trnS-trnG/ITS

Tabla 13. Lista de especies de *Lathyrus* utilizadas como grupo externo en los análisis filogenéticos y de variabilidad cloroplástica. Código de identificación de las secuencias extraídas de la base de datos pública, www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank.

<i>Lathyrus</i>	ADNcp/ADNn
Secc. Lathyrus	
<i>L. odoratus</i>	AY 839533/JN 617202
<i>L. sylvestris</i>	AY 839523/JX 506145
<i>L. tingitanus</i>	AY 839519/JX 506147
Secc. Lathyrostylis	
<i>L. filiformis</i>	AY 839536/AY 839354
<i>L. pallescens</i>	AY 839515/AY 839378
<i>L. spathulatus</i>	AY839513/JX 506139
Secc. Orobus	
<i>L. japonicus</i>	AY 839495/JX 506089
<i>L. jesponii</i>	AY 839496/AY 839362
<i>L. vernus.</i>	AY839430/AY 839403

Análisis de secuencias

Extracción de ADN genómico

La extracción de ADN genómico se llevó a cabo a partir de hojas frescas, hojas secadas en sílica gel o extraídas de ejemplares de herbario. Se utilizó el protocolo de extracción con CTAB modificado por Cullings (1992) a partir del protocolo de Doyle y Doyle (1987).

Se colocaron 20 mg de tejido foliar seco o 40 mg de tejido foliar fresco en un mortero con nitrógeno líquido y se maceró hasta la obtención de un polvo fino. El macerado fue trasvasado a un microtubo de 1,5 ml en donde se adicionaron 600 µl de buffer CTAB 2×. Se incubó a 60 °C durante 2 h con el fin de desnaturalizar las proteínas. Luego se agregaron a cada muestra 600 µl de cloroformo-alcohol isoamílico en una proporción 24:1 y se centrifugó durante 10 min a 12500 rpm. Se rescataron aproximadamente 450 µl del sobrenadante, a los que se le agregaron 36 µl de acetato de amonio frío y 233,28 µl de isopropanol. Se mezcló y se dejó precipitar a 4 °C durante 1 h. Posteriormente, se centrifugó a 14000 rpm durante 10 min a 4 °C y el pellet fue deshidratado en una serie de

etanol 70 %, 95 % y 99 % y secado a temperatura ambiente. El pellet fue resuspendido en 50 µl de buffer TE (pH= 8) y se lo incubó a 65 °C durante 15 min. Por último, se agregó 0,5 µl de ARNasa (10 ng/ml) y se incubó en estufa a 37 °C durante 1 h.

La calidad del ADN extraído se verificó en geles de agarosa 0,8 % teñidos con bromuro de etidio y observados en un transiluminador UV. La cuantificación se realizó en los mismos geles utilizando marcadores de masa conocida.

Amplificación de las regiones

En base a la variabilidad que presentaron distintas regiones cloroplásticas en trabajos realizados en numerosas especies de Leguminosas (Fennell *et al.* 1998, Kenicer *et al.* 2005, Firouzeh *et al.* 2007, Novaes *et al.* 2010) se seleccionaron inicialmente tres regiones (trnL^{UAA}-trnF^{GAA}, trnS^{GCU}-trnG^{UUC} y trnH^{GUG}-psbA) como potencialmente útiles para los trabajos a realizar en esta tesis. Para la amplificación de las regiones señaladas se utilizaron los cebadores universales publicados previamente según se señala en la Tabla 14.

Para los análisis de filogenia también se seleccionó a la región nuclear que comprende al ITS1, al gen ADNr 5,8S e ITS2 (que en adelante será denominada como ITS1-ITS2) de la unidad ribosomal 45S, ya que fue la secuencia de ADNn utilizada en estudios filogenéticos previos en *Lathyrus* (Kenicer *et al.* 2005). Los cebadores se detallan en la Tabla 14.

Tabla 14. Cebadores utilizados para amplificar las regiones de ADNcp y ADNn.

Cebador	Secuencia 5'- 3'	Procedencia
trnL ^{UAA}	GGT TCA AGT CCC TCT ATC CC	Taberlet <i>et al.</i> (1991)
trnF ^{GAA}	ATT TGA ACT GGT GAC ACG AG	
trnS ^{GCU}	GCC GCT TTA GTC CAC TCA GC	Hamilton (1999)
trnG ^{UUC}	GAA CGA ATC ACA CTT TTA CCA C	
trnH ^{GUG}	ACT GCC TTG ATC CAC TTG	Hamilton (1999)
psbA	CGA AGC TCC ATC TAC AAA TGG	
ITS 1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	White <i>et al.</i> (1990)
ITS 2	GCTGCGTTCTTCATCGATGC	

Para ajustar las reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) se realizaron curvas de masa y temperatura, variando las concentraciones de ADN, de cebadores, de dNTPs y de $MgCl_2$. Además, se pusieron a punto los tiempos de desnaturalización, hibridación y extensión, y el número de ciclos durante las reacciones de amplificación, para cada uno de los cebadores probados. Todas las reacciones de PCR fueron realizadas en un volumen final de 25 μ l.

Las reacciones de amplificación para la región $trnL^{UAA}$ - $trnF^{GAA}$ se realizaron con las siguientes concentraciones finales: buffer 1 \times ; $MgCl_2$ 1,5 mM; dNTPs 0,1 μ M; cebadores 0,8 μ M; Taq polimerasa (Invitrogen) 1 U y ADN 4 ng/ μ l. Los parámetros utilizados para la amplificación del segmento fueron: desnaturalización inicial (95 °C, 5 min) seguidos de 37 ciclos de desnaturalización (94 °C, 1 min), hibridación (53 °C, 1 min), extensión (72 °C, 2 min) y una extensión final de 72 °C durante 5 min.

Las reacciones para la región $trnS^{GCU}$ - $trnG^{UUC}$ se llevaron a cabo utilizando las siguientes concentraciones finales: buffer 1 \times ; $MgCl_2$ 3 mM; dNTPs 0,2 μ M; cebadores 0,08 μ M; Taq polimerasa (Invitrogen) 1 U y ADN 4 ng/ μ l. Los parámetros utilizados para la amplificación del segmento fueron: desnaturalización inicial (94 °C, 3 min); 29 ciclos de desnaturalización (94 °C, 1min), hibridación (58 °C, 1min) y extensión (72 °C, 45 s; y una extensión final de 72 °C durante 5 min.

Las amplificaciones de la región $trnH^{GUG}$ - $psbA$ se realizaron con las siguientes concentraciones finales: buffer 1 \times , Cl_2Mg 3mM, dNTPs 0,2 μ M, cebadores 0,16 μ M, Taq polimerasa (Invitrogen) 1 U, ADN 4 ng/ μ l. La extensión inicial fue de 94°C 3 min y 34 ciclos de desnaturalización (94 °C, 45 s), hibridación (58 °C, 1 min), extensión (72 °C, 2 min), y una extensión final de 72 °C durante 10 min.

Las reacciones de amplificación para la región ITS1-ITS2 se realizaron con las siguientes concentraciones finales: buffer 1 \times ; $MgCl_2$ 1,5 mM; dNTPs 0,1 μ M; cebadores 1,2 μ M; Taq polimerasa (Invitrogen) 1 U y ADN 4 ng/ μ l. Los parámetros utilizados para la amplificación del segmento fueron: desnaturalización inicial (95 °C, 5 min) seguidos de 37 ciclos de desnaturalización (94 °C, 1 min), hibridación (51 °C, 1 min), extensión (72 °C, 2 min) y una extensión final de 72 °C durante 5 min.

En cada reacción de amplificación se incluyó una muestra control sin ADN molde con el fin de verificar la ausencia de contaminación.

Los productos de amplificación fueron visualizados en geles de agarosa 1,4 % teñidos con bromuro de etidio durante 20 min, usando un transiluminador UV, y sus tamaños fueron comparados con un marcador de tamaño conocido.

Purificación y secuenciación

Los productos de amplificación fueron purificados y secuenciados utilizando el servicio de Macrogen© Inc. Seoul, Corea. Se secuenciaron las dos cadenas de cada uno de los productos de amplificación para identificar los sitios variables sin ambigüedades.

Las secuencias obtenidas fueron leídas y corregidas en el programa Chromas 2.0 (<http://www.thecnelysium.com.au/chromas.html>). El alineamiento de las secuencias se realizó, de forma automática y manual, utilizando el programa Mega 4 (Tamura *et al.* 2007). El término indel fue utilizado para denominar a los espacios incorporados manualmente con el fin de optimizar los alineamientos.

Análisis Filogenéticos

Los análisis filogenéticos se realizaron utilizando la región cloroplástica intergénica trnS-trnG y la región nuclear ITS1-ITS2. Las otras dos regiones cloroplásticas ensayadas (trnL^{UAA}-trnF^{GAA} y trnH^{GUG}-psbA) en una prueba preliminar, que incluyó a especies representativas de toda la sección, fueron descartadas por carecer de polimorfismo.

Los análisis se realizaron utilizando el criterio de parsimonia mediante el programa PAUP versión 4.0b10 (Swofford 2002). Se construyeron dos matrices, una para cada tipo de secuencias. Los indels fueron tomados como un único evento mutacional y codificados siguiendo el criterio de Simmons y Ochotorena (2000). Las microinversiones también fueron tomadas como un único evento mutacional. El modelo evolutivo elegido para los distintos análisis fue el de Jukes y Cantor (1969). Todos los caracteres tuvieron igual peso y fueron considerados no aditivos.

Para la construcción de los árboles se realizó una búsqueda heurística para cada conjunto de datos mediante permutación de ramas (TBR), con 1000 repeticiones de secuencias de adición al azar. A partir de todos los árboles igualmente parsimoniosos se construyeron los árboles consenso siguiendo el criterio de la mayoría (>50). También, se estimaron medidas de soporte de las ramas mediante búsquedas heurísticas de 1000 réplicas de “*bootstrap*” (Felsenstein 1985). Los árboles fueron visualizados y editados usando el programa Tree View (Page 1996).

RESULTADOS

Las características de las secuencias analizadas se resumen en la Tabla 15. Tanto las secuencias cloroplásticas como las nucleares aisladas de las especies de *Notolathyrus* presentaron longitudes similares con las secuencias de las especies de otras secciones de *Lathyrus* (*Lathyrus*, *Lathyrostilis* y *Orobus*) y de *Vicia* tomadas como grupos externos.

Región cloroplástica intergénica trnS-trnG

El alineamiento de las secuencias de la región cloroplástica intergénica trnS-trnG obtenidas a partir de los 29 taxones analizados en este estudio presentó una longitud de 819 pb, incluyendo indels (Matriz 1, Anexo). Se observaron 192 caracteres variables, de los cuales 67 (8,18 %) fueron parsimoniosamente informativos. Por otra parte, se registraron 32 eventos de inserción/delección con extensiones que variaron entre 2 y 127 nucleótidos (Tabla 16). El género *Lathyrus* se diferenció de *Vicia* por dos indels, uno de 127 pb en posición 56-183 y otro de 5 pb en posición 160-165. La sección *Lathyrostilis* se diferenció del resto de las secciones de *Lathyrus* y de *Vicia* por 3 indels de 5, 11 y 28 pb, en posición 524-529, 518-529, 223-251, respectivamente. Las secciones *Lathyrus* y *Lathyrostilis* compartieron un indel de 3 pb en posición 75-78 y la sección *Notolathyrus* se diferenció del resto de las secciones por un indel de 42 pb en posición 694-736 (Tabla 16). El resto de las inserciones/delecciones que se registraron fueron, en general, particulares de especies.

El análisis de Parsimonia de las secuencias trnS-trnG fue realizado enraizando a los árboles en *Vicia cracca*. Se generaron 12 árboles más parsimoniosos (AMP) constituidos por 268 pasos. Los árboles presentaron un índice de consistencia (IC) de 0,862 y un índice de retención (IR) de 0,867. A partir de estos árboles, se construyó un árbol consenso siguiendo el criterio de la mayoría (Fig. 23). En el árbol consenso, se observó una politomía basal formada por dos grandes clados de *Lathyrus*. Uno de ellos integrado por las especies de las secciones *Lathyrus*, *Lathyrostilis* y *Orobus* [Bootstrap (BS) = 100 %] y el otro, por los 19 taxones pertenecientes a la sección *Notolathyrus* (BS = 100).

Tabla 15. Características de las secuencias trnS-trnG e ITS1-ITS2 para las 29 taxones de *Lathyrus* y *Vicia* analizadas.

Características de las secuencias	trnS-trnG	ITS
	pb	pb
Longitud del alineamiento	819	608
Sitios constantes	606	480
Sitios variables	192	134
Sitios parsimoniosamente informativos	67	48

Dentro del clado conformado por las especies sudamericanas, *L. tropicalandinus* se presentó como la especie más basal (BS = 100) y, posteriormente, se separó la especie anual *L. crassipes* (BS = 100). Las demás especies pertenecientes a la sección se agruparon en un subclado (BS = 100) dentro del cual se reconocieron dos grupos (**A** y **B**), ambos con muy buen soporte. El grupo **A** quedó formado por *L. nervosus*, *L. macrostachys*, *L. nigrivalvis* y las 3 variedades de *L. magellanicus* analizadas. De estas tres variedades, la variedad *tucumanensis* se separó de las otras dos quedando incluida en una politomía junto con *L. paranensis*. El grupo **B** presentó una gran politomía basal e incluyó a las restantes especies de la sección *Notolathyrus*. Dentro de este grupo se reconocieron dos subgrupos. Uno de ellos, agrupó a *L. cabrerianus*, *L. multiceps* y *L. subandinus* (BS = 67), dentro del cual, las dos últimas especies quedaron íntimamente asociadas. En el otro subgrupo, *L. tomentosus*, *L. pubescens* y *L. macropus* (BS = 100) quedaron asociadas en una politomía. Las otras especies, *L. hasslerianus*, *L. linerifolius*, *L. nitens* y *L. subulatus* se desprendieron individualmente de la politomía basal.

Todas las especies de *Lathyrus* usadas como grupos externos conformaron un clado separado de las especies de *Notolathyrus* (BS = 100). Dentro de este clado, todas las especies de la sección *Orobus* quedaron definidas en un único grupo (BS = 100) y las especies de la sección *Lathyrostilis* y *Lathyrus* formaron otro grupo bien definido (BS = 100). Dentro de este último, las especies de la sección *Lathyrostilis* quedan agrupadas (BS = 100) en una politomía con las especies de la sección *Lathyrus*.

Tabla 16. Detalle de los indels observados en la región cloroplástica intergénica trnS-trnG de las especies de *Lathyrus* y *Vicia* analizadas. Los números indican la posición del inicio y terminación de los indels en el alineamiento. Las cruces indican la presencia del segmento, los guiones indican la ausencia.

Posición en el alineamiento	56- 183	75- 89	75- 78	76- 89	77- 80	105- 139	160- 165	198- 213	205- 214	207- 214	223- 224	223- 251
Secc. Notolathyrus												
<i>L. cabrerianus</i>	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	X	-
<i>L. crassipes</i>	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	X	-
<i>L. hasslerianus</i>	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	X	-
<i>L. linearifolius</i>	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	X	-
<i>L. macropus</i>	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	X	-
<i>L. macrostachys</i>	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	X	-
<i>L. magellanicus</i> var <i>glauscesens</i>	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	X	-
<i>L. magellanicus</i> var. <i>magellanicus</i>	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	X	-
<i>L. magellanicus</i> var. <i>tucumanensis</i>	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	X	-
<i>L. multiceps</i>	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	X	-
<i>L. nervosus</i>	-	X	-	-	-	X	-	-	-	-	X	-
<i>L. nigrivalvis</i>	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	X	-
<i>L. nitens</i>	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	X	-
<i>L. paranensis</i>	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	X	-
<i>L. pubescens</i>	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	X	-
<i>L. subandinus</i>	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	X	-
<i>L. subulatus</i>	-	-	-	-	X	X	-	-	-	-	X	-
<i>L. tomentosus</i>	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	X	-
<i>L. tropicalandinus</i>	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	X	-
Secc. Lathyrostylis												
<i>L. filiformis</i>	-	-	X	-	-	X	-	-	X	-	-	X
<i>L. pallences</i>	-	-	X	-	-	X	-	-	X	-	-	X
<i>L. spathulatus</i>	-	-	X	-	-	X	-	-	X	-	-	X
Secc. Lathyrus												
<i>L. odoratus</i>	-	-	X	-	-	X	-	X	-	X	X	-
<i>L. sylvestris</i>	-	-	X	-	-	X	-	-	-	X	X	-
<i>L. tinginatus</i>	-	-	X	-	-	X	-	-	X	-	X	-
Secc. Orobus												
<i>L. japonicus</i>	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-
<i>L. jesponii</i>	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. vernus</i>	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	X	-
Vicia												
<i>V. cracca</i>	X	-	-	-	-	X	X	-	-	-	X	-

Continuación de la Tabla 16.

Posición en el alineamiento	233-247	281-319	281-325	324-338	335-338	355-358	392-396	422-429	447-454	464-467	518-529	524-529
Secc. Notolathyrus												
<i>L. cabrerianus</i>	-	X	-	-	-	X	-	-	X	X	-	X
<i>L. crassipes</i>	-	X	-	-	-	X	-	-	-	X	-	X
<i>L. hasslerianus</i>	-	X	-	-	-	X	-	X	X	X	-	X
<i>L. linearifolius</i>	-	X	-	-	-	-	-	-	X	X	-	X
<i>L. macropus</i>	-	X	-	-	-	X	-	-	X	X	-	X
<i>L. macrostachys</i>	-	X	-	-	-	X	-	-	X	X	-	X
<i>L. magellanicus</i> var. <i>glauscesens</i>	-	X	-	-	-	X	-	-	X	X	-	X
<i>L. magellanicus</i> var. <i>magellanicus</i>	-	X	-	-	-	X	-	-	X	X	-	X
<i>L. magellanicus</i> var. <i>tucumanensis</i>	-	X	-	-	-	X	-	-	X	X	-	X
<i>L. multiceps</i>	-	X	-	-	-	X	-	-	X	X	-	X
<i>L. nervosus</i>	-	X	-	-	-	X	-	-	X	X	-	X
<i>L. nigrivalvis</i>	-	X	-	-	-	X	-	-	X	X	-	X
<i>L. nitens</i>	-	X	-	-	-	X	-	-	X	X	-	X
<i>L. paranensis</i>	-	X	-	-	-	X	-	-	X	X	-	X
<i>L. pubescens</i>	-	X	-	-	-	X	-	-	X	X	-	X
<i>L. subandinus</i>	-	X	-	-	-	X	-	-	X	X	-	X
<i>L. subulatus</i>	-	X	-	-	-	X	-	-	X	X	-	X
<i>L. tomentosus</i>	-	X	-	-	-	X	-	-	X	X	-	X
<i>L. tropicalandinus</i>	-	-	-	-	-	X	-	-	X	X	-	X
Secc. Lathyrostylis												
<i>L. filiformis</i>	-	X	-	-	-	X	-	-	X	X	X	-
<i>L. pallences</i>	-	X	-	-	-	X	-	-	X	X	X	-
<i>L. spathulatus</i>	-	X	-	-	-	X	-	-	X	X	X	-
Secc. Lathyrus												
<i>L. odoratus</i>	-	-	X	-	-	X	-	-	X	-	-	X
<i>L. sylvestris</i>	-	X	-	-	-	X	-	-	X	X	-	X
<i>L. tinginatus</i>	X	X	-	X	-	X	X		X	X	-	X
Secc. Orobus												
<i>L. japonicus</i>	-	X	-	-	-	X	-	-	X	X	-	
<i>L. jesponii</i>	-	X	-	-	X	X	-	-	X	X	-	X
<i>L. vernus</i>	-	X	-	-	-	X	-	-	X	X	-	X
Vicia												
<i>V. cracca</i>	-	X	-	-	-	X	-	-	X	X	-	X

Continuación de la Tabla 16.

Posición en el alineamiento	542- 544	674- 682	673- 686	691- 695	691- 736	694- 752	779- 782	785- 786
Secc. Notolathyrus								
<i>L. cabrerianus</i>	X	X	-	X	-	-	-	X
<i>L. crassipes</i>	X	X	-	X	-	-	-	X
<i>L. hasslerianus</i>	X	X	-	X	-	-	-	X
<i>L. linearifolius</i>	X	X	-	X	-	-	-	X
<i>L. macropus</i>	X	X	-	X	-	-	-	X
<i>L. macrostachys</i>	-	X	-	X	-	-	-	X
<i>L. magellanicus</i> var. <i>glausescesens</i>	X	-	X	X	-	-	-	X
<i>L. magellanicus</i> var. <i>magellanicus</i>	X	-	X	X	-	-	-	X
<i>L. magellanicus</i> var. <i>tucumanensis</i>	X	X	-	X	-	-	-	X
<i>L. multiceps</i>	X	X	-	X	-	-	-	X
<i>L. nervosus</i>	X	X	-	X	-	-	-	X
<i>L. nigrivalvis</i>	X	-	X	X	-	-	-	X
<i>L. nitens</i>	X	X	-	X	-	-	-	X
<i>L. paranensis</i>	X	X	-	X	-	-	-	X
<i>L. pubescens</i>	X	X	-	X	-	-	-	X
<i>L. subandinus</i>	X	-	X	X	-	-	-	X
<i>L. subulatus</i>	X	X	-	X	-	-	-	X
<i>L. tomentosus</i>	X	X	-	X	-	-	-	X
<i>L. tropicalandinus</i>	X	X	-	X	-	-	-	X
Secc. Lathyrostylis								
<i>L. filiformis</i>	X	-	-	-	X	X	-	X
<i>L. pallences</i>	X	-	-	-	X	X	-	X
<i>L. spathulatus</i>	X	-	-	-	X	X	-	X
Secc. Lathyrus								
<i>L. odoratus</i>	X	-	-	-	-	X	-	X
<i>L. sylvestris</i>	X	-	-	-	-	X	-	X
<i>L. tinginatus</i>	X	-	-	-	X	-	X	X
Secc. Orobus								
<i>L. japonicus</i>	X	-	-	-	X	X	-	X
<i>L. jesponii</i>	X	-	-	-	X	X	-	X
<i>L. vernus</i>	X	-	-	-	X	X	-	-
Vicia								
<i>V. cracca</i>	X	-	-	-	X	X	-	X

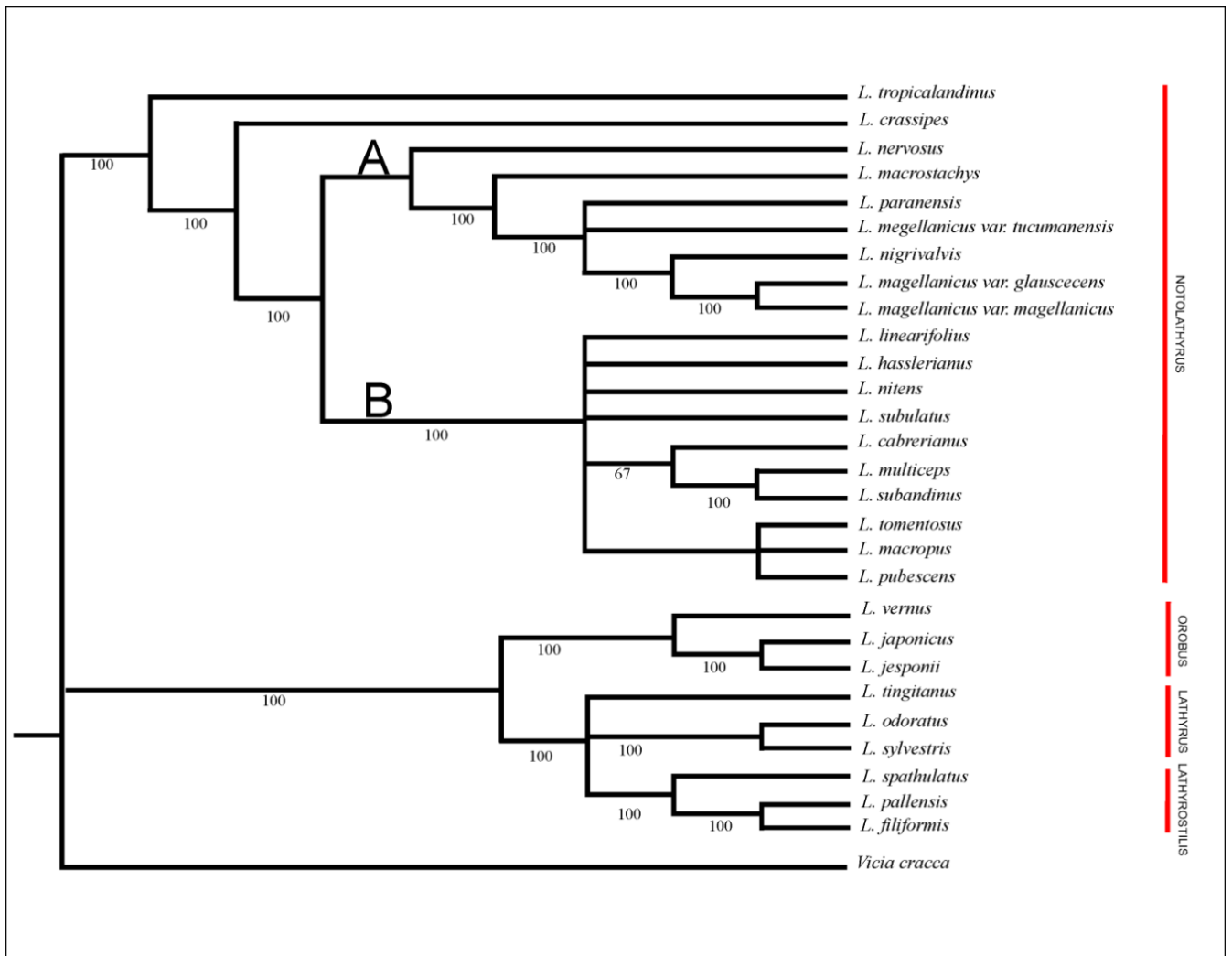


Figura 23. Árbol consenso de los 12 árboles más parsimoniosos obtenido a partir de las secuencias intergénicas cloroplásticas trnS-trnG (regla de la mayoría). Los valores de *bootstrap* > 50 % se indican debajo de las ramas respectivas. Las barras verticales en rojo corresponden a las distintas secciones analizadas. Las letras **A** y **B** indican los grupos dentro de la sección Notolathyrus.

Región ITS1-ITS2

En este análisis se incluyó a la especie *L. parodii* y se excluyeron las especies *L. nigrivalvis* y *L. tropicalandinus* debido a que, a pesar de reiterados intentos, no fue posible amplificar la secuencia nuclear de los ejemplares de herbario utilizados.

El alineamiento de las secuencias de ADNn, de los 27 taxones analizados produjo una secuencia de 608 pb (Matriz 2, Anexo), con 134 sitios variables de los cuales 48 (7,89 %) fueron filogenéticamente informativos (Tabla 15). Se detectaron 4 indels cuya longitud varió de 1 a 13 pb. El indel de sólo 1 pb fue compartido por las especies de la sección *Lathyrostylis* y dos especies pertenecientes a la sección *Orobus*. Dos de los indels detectados tuvieron 2 pb de longitud. Uno de ellos, en posición 237-238, diferenció a todas las especies del género *Lathyrus* analizadas de *Vicia cracca*, mientras que el otro, en posición 470-471, distinguió a *L. nitens* del resto de las especies. El indel de 13 pb, en posición 416-431 fue característico de la sección *Lathyrus*. También, se observaron dos microinversiones. Una de ellas involucró a dos pares de bases (posición 12 y 13) y fue detectada en *L. magellanicus* var. *tucumanensis* y la otra con tres pares de bases (posición 183 a 185) de longitud diferenció a todas las especies del género *Lathyrus* analizadas de *Vicia cracca*.

El análisis de Parsimonia de las secuencias ITS generó 4 árboles más parsimoniosos construidos en 157 pasos. Los árboles presentaron un índice de consistencia (IC) de 0,917 y un índice de retención (IR) de 0,817. Los árboles fueron enraizados en *V. cracca*. A partir de estos árboles, se construyó un árbol consenso siguiendo el criterio de la mayoría (Fig. 24).

En el árbol consenso se observó una politomía basal que incluyó a *Vicia*, un clado con las tres especies de *Lathyrostylis* (BS = 100) y otro que agrupó a las especies restantes (BS = 100). Dentro de este último, se distinguieron dos subclados, uno integrado por especies de *Orobus* (BS = 100) y el otro que agrupó a las demás especies de *Lathyrus* analizadas. Este último subclado, incluyó en una politomía basal a las especies de la sección *Lathyrus* y a *L. vernus* (Sección *Orobus*) y a la sección *Notolathyrus* como grupo monofilético. Las especies de esta última sección se agruparon en una politomía que incluyó a *L. paranensis*, al subgrupo que asoció a *L. subulatus* y *L. nitens* (subgrupo **1**), a *L. pubescens* y al subgrupo que incluyó a las demás especies (subgrupo **2**). Dentro de este último subgrupo, se observaron tres asociaciones entre especies, *L. multiceps* y *L. subandinus* (**A**), *L. magellanicus* var. *tucumanensis* y *L. tomentosus* (**B**), y *L. parodii* y *L. hasslerianus* (**C**).

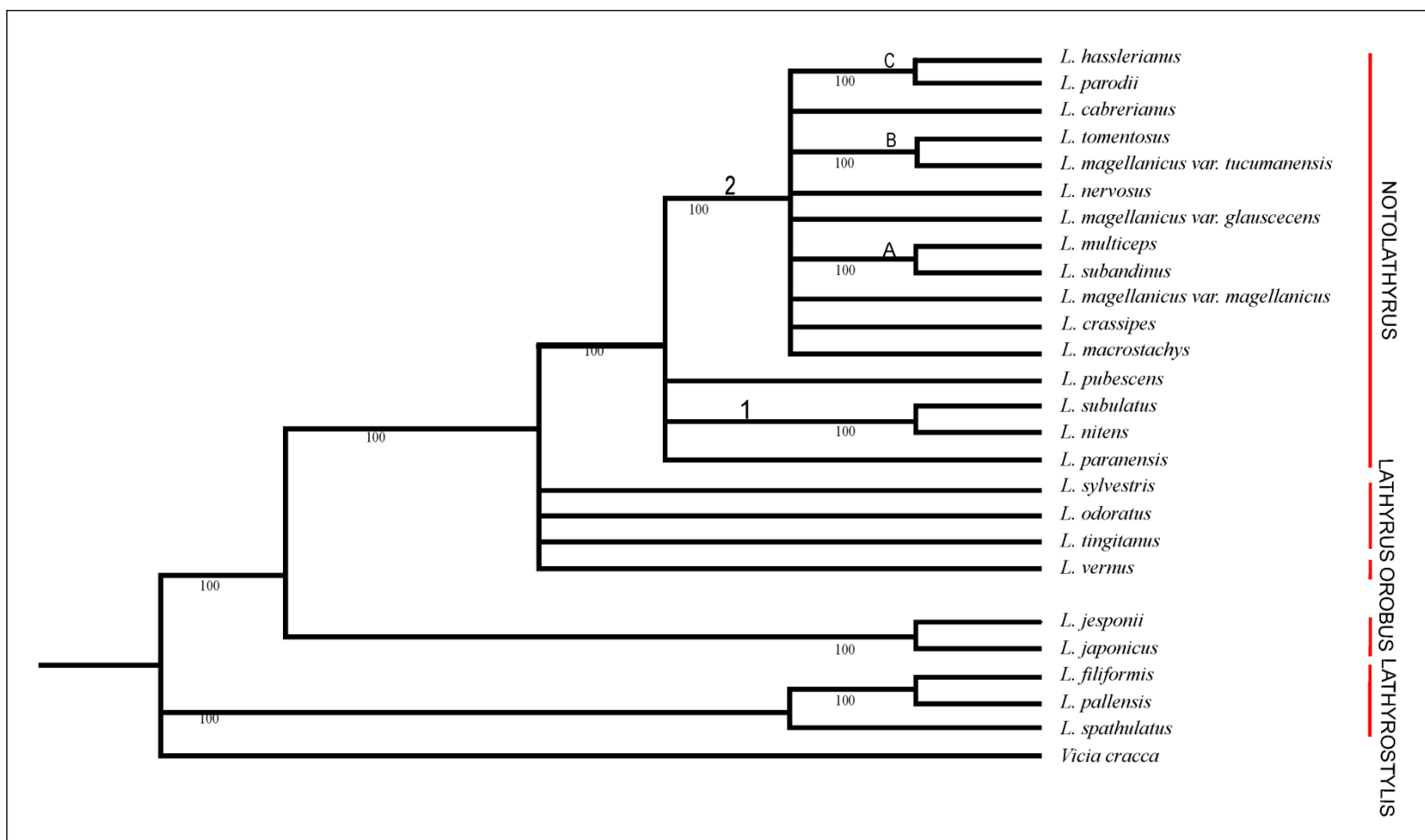


Figura 24. Árbol consenso obtenido de los 4 árboles más parsimoniosos construidos a partir de secuencias ITS1-ITS2 (regla de la mayoría). Los valores de *bootstrap* > 50 % se indican debajo las ramas respectivas. Las barras verticales en rojo corresponden a las distintas secciones analizadas.

DISCUSIÓN

Los árboles construidos en este Capítulo a partir de las secuencias cloroplásticas y nucleares mostraron a la sección *Notolathyrus* como un grupo monofilético, separado de las otras secciones de *Lathyrus*. Estos resultados sustentan la asignación de las especies sudamericanas de *Lathyrus* a una sección particular, *Notolathyrus*, de acuerdo a los análisis morfológicos (Kupicha 1983), cariotípicos (Seijo y Fernández 2003, Capítulo II de esta tesis) y de secuencias (Kenicer *et al.* 2005). Estos resultados se contraponen claramente a la propuesta de Asmussen y Liston (1998) de incluir a las especies sudamericanas como parte de la sección *Orobus* deducida a partir del análisis de RFLP de cloroplastos.

En cuanto a las relaciones evolutivas de la sección *Notolathyrus* con otras secciones del género, la gran politomía basal observada en el árbol de secuencias cloroplásticas impide establecer alguna relación entre las secciones. Por otra parte, el agrupamiento de *Notolathyrus* con todas las especies analizadas de la sección *Lathyrus* y con *L. vernus* de la sección *Orobus* serie *Vernii* (endémica de Eurasia), en una politomía separada del grupo de las especies de la sección *Orobus* de Norteamérica observado en el árbol de secuencias de ADNn, sugiere que la sección *Notolathyrus* estaría más relacionada con especies del Mediterráneo (sección *Lathyrus*) que con las especies de Norteamérica (*L. jespunii* y *L. japonicus*). Esta relación también fue observada por Kenicer *et al.* (2005), aunque en dicho análisis las especies de las secciones *Aphaca* y *Pratensis* (no analizadas en esta tesis) fueron las que se presentaron como grupos hermanos de *Notolathyrus*.

A nivel morfológico, las especies sudamericanas presentaron mayor similitud con las especies de las secciones *Lathyrystylis*, *Clymenum*, *Linearicarpus*, y *Nissolia* (Simola 1968, Kupicha 1983) del Mediterráneo y regiones aledañas. Las especies de *Notolathyrus* comparten con otras secciones caracteres tales como, folíolos elípticos y angostos, venación paralela, estilo espatulado, estigma dividido y frutos con septos entre las semillas, aunque en ninguna especie sudamericana se presentan todos estos caracteres juntos. El análisis cariotípico también evidenció que la sección *Notolathyrus* presenta patrones de heterocromatina más similares a los observados en las especies de las secciones *Lathyrystylis* y *Clymenum* que en las de *Orobus* (Capítulo II). Por lo tanto, los caracteres morfológicos, cromosómicos y de secuencias nucleares sugieren una relación más estrecha de *Notolathyrus* con las secciones del Mediterráneo que con las de *Orobus*.

La hipótesis, históricamente, más aceptada sobre el origen de la sección *Notolathyrus* (Burkart 1935, Kupicha 1983), y sustentada por datos de RFLP ADNcp (Asmussen y

Liston 1998), propone que las especies sudamericanas de *Lathyrus* habrían derivado de las especies de América del Norte. De acuerdo a Kupicha (1983) y Asmussen y Liston (1998) el género *Lathyrus* se habría originado en las altas latitudes del viejo continente, en el Cretácico o Terciario temprano. Desde este centro de origen, las especies de *Lathyrus* con características similares a las de *Orobanchaceae* habrían migrado hacia Norteamérica, por Groenlandia o por Alaska, y luego, de Norteamérica hacia Sudamérica, donde se habría originado la sección *Notolathyrus*. Esta ruta de dispersión, desde Norteamérica hacia Sudamérica, está basada en la concepción de que *Notolathyrus* estaría constituido por taxones derivados de la flora holártica (Lavin y Luckow 1993) que habrían ingresado hacia Sudamérica a través del istmo de Panamá, cuyo cierre ocurrió durante el Plioceno (hace aproximadamente 5 Ma). En ese periodo, la Cordillera de los Andes llegó a sus máximas elevaciones, sirviendo de puente templado-frío (Simpson 1983, Van der Hammen y Hooghiemstra 2001) para la migración de las especies microtéricas desde Norteamérica hacia Sudamérica.

Sin embargo, la asociación de las especies de *Notolathyrus* con las especies del Mediterráneo observada en esta tesis, en el árbol de ADNn, y en el trabajo de Kenicer *et al.* (2005), así como la mayor similitud morfológica y cromosómica de las especies sudamericanas con las europeas, cuestionan la hipótesis de migración de *Lathyrus* desde Norteamérica hacia Sudamérica y sugieren otros escenarios biogeográficos. Una hipótesis alternativa para explicar el origen de *Notolathyrus* fue planteada por Kenicer *et al.* (2005) quienes propusieron la dispersión de semillas, a larga distancia, a través del Océano Atlántico desde el Sur de Eurasia hasta Sudamérica. Aunque este tipo de dispersión no ha sido probada, la aparición de *L. japonicus* en las costas de Chile ha sido explicada por Burkart (1935) como consecuencia de la dispersión transoceánica de semillas. Sin embargo, ni los datos existentes ni los aquí obtenidos proveen evidencias suficientes para esclarecer el origen de las especies sudamericanas.

Relaciones filogenéticas interespecíficas de *Notolathyrus*

Las topologías de los árboles y los grupos obtenidos a partir del análisis de secuencias nucleares y cloroplásticas resultaron incongruentes sugiriendo distintas historias evolutivas para cada una de ellas. Existen distintas causas que tratan de explicar las incongruencias filogenéticas obtenidas a partir de diferentes sets de datos, entre ellos se encuentran: la hibridación (Palmer *et al.* 1983) e introgresión con captura cloroplástica (Riesberg y Wendel 1993) y la retención de polimorfismos ancestrales (Soltis y Kuzoff 1995). El hecho

que no se hayan detectado hasta el momento híbridos naturales entre las especies de *Notolathyrus* (Seijo comunicación personal) y que en cruzamientos artificiales las especies de *Lathyrus* muestran un alto grado de aislamiento reproductivo (Hammet *et al.* 1994, Nandini *et al.* 1999) sugiere que la incongruencia topológica observada entre los árboles de ADNcp y ADNn construidos en este Capítulo se explicaría más probablemente por la retención de polimorfismo ancestral.

En el árbol de ADNcp, la posición ancestral de *L. tropicalandinus* sería compatible con la hipótesis del origen de *Notolathyrus* a partir de las especies que han migrado desde Norteamérica. Esto es debido a que esta especie habita en una estrecha faja húmeda de las Sierras Subandinas de Salta, Tucumán y Catamarca, asociada a la selva Tucumano-Oranense, franja que podría haber actuado como corredor en las migraciones hacia el Sur de las especies de *Lathyrus*. Sin embargo, esta hipótesis no es congruente con los otros datos obtenidos en este análisis y en los Capítulos anteriores.

Por otro lado, el hecho de que la única especie reconocida como anual en la sección *Notolathyrus*, *L. crassipes*, sea la segunda especie en desprenderse en el árbol, a partir de linajes perennes, sugiere que la transición de perenne a anual en *Notolathyrus* ocurrió en las etapas tempranas de la diversificación del grupo. Esta transición dentro de la sección *Notolathyrus*, sumado a la detectada en la sección *Lathyrus* y a existencia de secciones derivadas exclusivamente constituidas por taxones anuales (*Aphaca*, *Clymenum*, *Linearicarpus*, *Orobastrum*), confirma la hipótesis que propone que en el género habrían ocurrido varios eventos de transición entre anualidad y perennidad (Kenicer *et al.* 2005).

Los dos grandes agrupamientos (**A** y **B**) que se observan entre las especies restantes de *Notolathyrus* en el árbol de ADNcp no son consistentes con la distribución geográfica de las especies que incluyen. Solamente se observan agrupamientos coincidentes con la distribución geográfica dentro de algunos subgrupos de especies. Sin embargo, las especies que quedan asociadas en cada uno de estos grupos presentan similitudes en las características de los frutos. Las especies incluidas en el grupo **A** presentan frutos oscuros y glabros mientras que las del grupo **B** presentan frutos castaños y pubescentes. Es interesante señalar que las especies que se desprenden basalmente en el árbol (*L. tropicalandinus* y *L. crassipes*) presentan una combinación de caracteres de ambos grupos, frutos castaños y glabros. Tomando en cuenta la filogenia obtenida, a partir de secuencias de ADNcp, en la cual los dos grupos perennes formados habrían derivado de un ancestro primitivo con características similares a *L. tropicalandinus*, en el grupo **A** debería haber aparecido el carácter fruto oscuro como novedad quedando como plesiomórfico el carácter

frutos glabros; mientras que en el grupo **B**, la pubescencia del fruto habría aparecido como novedad quedando como plesiomórfico el carácter color castaño.

El agrupamiento de *L. cabrerianus*, *L. multiceps* y *L. subandinus* observado dentro del grupo **B** en el árbol de ADNcp coincide con la distribución geográfica de las especies, ya que todas estas habitan en el centro y sur de la Cordilleras de los Andes de Argentina y Chile. La asociación entre *L. multiceps* y *L. subandinus* (**A**) también se evidenció en el árbol de ADNn. Este patrón de relaciones es consistente con la morfología de las especies ya que *L. multiceps* y *L. subandinus* presentan tallos erectos o decumbentes y breves, no trepadores, no alados, además las flores son azules; mientras que *L. cabrerianus* posee tallos trepadores y las flores son albolúteas.

Los agrupamientos **B** y **C** observados en el árbol de ADNn no se asocian ni con la morfología ni con la distribución de las especies. La asociación entre *L. nitens* y *L. subulatus* (subgrupo **1**) es consistente con la distribución geográfica de las especies aunque en menor medida con la morfología de las especies.

Lathyrus magellanicus presenta cinco variedades botánicas, var. *magellanicus*, var. *glaucescens*, var. *longipes* (Phil.) Burk., var. *gladius* Kuntze y var. *tucumanensis*, que se diferencian morfológica y geográficamente. Sin embargo, cuatro de ellas se distribuyen en la región Patagónica y presentan áreas parcialmente solapadas (Burkart 1935, Rossow 1982); mientras que, *L. magellanicus* var. *tucumanensis* se concentra en el noroeste de Argentina. Esta última variedad se encuentra separada de las demás por más de 1200 km de distancia. Los resultados de la filogenia de ADNcp son congruentes con este patrón geográfico debido a que si bien las tres variedades analizadas se encuentran en el clado **A**, las dos variedades patagónicas (var. *magellanicus* y *glaucescens*) aparecen como hermanas mientras que la var. *tucumanensis* queda separada. Esta segregación también se observa en el árbol de ADNn, en el que *L. magellanicus* var. *tucumanensis* aparece en un clado junto con *L. tomentosus* y separada de las demás variedades analizadas. La segregación de *L. magellanicus* var. *tucumanensis* de las demás variedades, observada en los dos árboles, en conjunto con su distribución geográfica disyunta y la posesión de caracteres morfológicos particulares sugieren que la posición taxonómica de esta variedad debería ser revisada.

CAPÍTULO V

ANÁLISIS DE LA VARIABILIDAD
DEL ADN CLOROPLÁSTICO

INTRODUCCIÓN

Los patrones de variación genética usualmente se relacionan con las características ecológicas de las especies, tales como la amplitud de su distribución geográfica, los tipos de ambientes que ocupan y su demografía. El estudio combinado de estos aspectos permite conocer su dinámica poblacional, los mecanismos de adaptación y evolución (Barret y Kohn 1991, Ellstrand y Elam 1993, Zawko *et al.* 2001).

Los procesos históricos, como la expansión de la distribución geográfica, la fragmentación y los cuellos de botella en las poblaciones, ocurridos en respuesta a cambios climáticos y geológicos parecen haber influido fuertemente en los patrones de la variación genética que presentan (Schaal *et al.* 1998). En numerosos estudios, los patrones de variabilidad genética actuales inferidos a través de marcadores moleculares han sido explicados por cambios geológicos y climáticos ocurridos mayormente durante el Pleistoceno (Fowler y Morris 1977, Cwynar y MacDonald 1987, Sherman-Broyles *et al.* 1992, Zabinski 1992, Kuser *et al.* 1997, Parker *et al.* 1997). Estudios palinológicos y climáticos han mostrado que Sudamérica ha sido afectada por cambios climáticos desde el Plioceno (5-1,8 Ma) hasta el Pleistoceno tardío (25000-12000 Ma) como consecuencia de glaciaciones cíclicas (Colinvaux *et al.* 2000). Si bien este continente no ha sufrido extensas glaciaciones, el clima se modificó considerablemente debido a cambios en la temperatura y en los regímenes pluviométricos (Damuth y Fairbridge 1970, Ab'Sáber 1977, 1982, Markgraf y Bradbury 1982, Clapperton 1993, Iriando 1999). A pesar de la extensión de Sudamérica y de los complejos patrones de respuesta a los cambios paleobiogeográficos, en general, se han propuesto que las respuestas han sido de las especies individualmente,

de acuerdo a sus tolerancias ecológicas, y no de comunidades (McLachlan *et al.* 2005, Quiroga y Premoli 2007). En general se ha propuesto que las especies de montañas durante los periodos glaciares o fríos se refugiaron en áreas bajas y, durante los periodos cálidos, se conservaron en tierras altas (Colinvaux *et al.* 2000, Villagrán 2001, Quiroga 2009). Asimismo, las especies de tierras bajas asociadas a climas templados fueron favorecidas en zonas mayor latitud (más cálidas) durante los periodos glaciares o sufrieron fuertes contracciones en sus áreas de distribución (Pennington *et al.* 2000). Todos estos cambios en la distribución de las especies habrían afectado los patrones de variabilidad genética de las mismas. Estos cambios en los patrones de variabilidad genética pueden, en muchos casos, ser detectados en el presente y mediante su análisis se pueden inferir los procesos evolutivos que, en el pasado, afectaron a las poblaciones (Avice 2000).

Las aproximaciones hacia el estudio de la variabilidad genética interespecífica existente en las especies de *Lathyrus* ha comprendido el uso de isoenzimas (Chowdhury y Slinkard 2000, Ben Brahim *et al.* 2002) y de marcadores moleculares (RAPD y RFLP) (Asmussen y Liston 1998, Croft *et al.* 1999, Chtourou-Ghorbel *et al.* 2002). A nivel intraespecífico, los estudios realizados en *Lathyrus sativus* utilizando isoenzimas revelaron que la variabilidad genética encontrada no se correspondió con los caracteres morfológicos ni con la distribución geográfica de las poblaciones (Yunus *et al.* 1991). Asimismo, se han utilizado marcadores ISSR como herramienta para evaluar la diversidad genética y determinar las relaciones de cinco poblaciones de tres especies del género *Lathyrus* abarcando un amplio rango geográfico. Este estudio evidenció una elevada diversidad genética entre y dentro de las poblaciones, aunque dicha variación no presentó relación con la distribución geográfica de las poblaciones ni con las especies (Belaïd *et al.* 2006).

Las especies de *Notolathyrus* ocupan un amplio rango geográfico y climático en Sudamérica (Burkart 1935, 1942, Seijo 2002). Además, las especies pueden presentar una amplia distribución con poblaciones densas (como *L. pubescens*, *L. magellanicus* y *L. nervosus*) o una distribución muy restringida con poblaciones constituidas por muy pocos individuos (como *L. hasslerianus*, *L. paranensis* y *L. cabrerianus*). Todas las especies poseen poblaciones alopátricas, muchas veces separadas por varias decenas o por cientos de kilómetros. Si bien las especies presentan adaptaciones para un amplio rango de hábitats, Burkart (1935) y Seijo (2002) establecen tres centros de riqueza específica: las cuencas de los ríos Paraná y Uruguay (CRPU), las sierras de Buenos Aires, Uruguay y sur de Brasil (SBUB) y los bosques patagónicos en Argentina (BP). En base a observaciones personales de la distribución geográfica de colecciones antiguas y nuevas, en esta tesis se

propone un cuarto centro de riqueza específica que se localiza en las sierras subandinas y cordobesas (SSAC). En cada centro se encuentran algunas especies endémicas aunque también existen poblaciones de especies con distribución geográfica amplia que pueden abarcar dos o tres de los centros y las regiones extra centros. Entre estas últimas especies se encuentra *L. pubescens* que se distribuye en la mayor parte del área de la sección, excepto en la Patagonia Austral.

Las variaciones observadas en las especies de la sección *Notolathyrus*, tanto en su distribución geográfica como en el número y tamaño de las poblaciones que las componen, sugieren que la variabilidad genética entre los taxones seguiría diferentes patrones, con distintos grados de diferenciación genética entre las mismas. Además, dentro de las especies, se esperaría que aquellas con amplia distribución y que ocupan numerosos nichos ecológicos tengan una mayor variabilidad genética que aquellas que presentan una distribución restringida y que habitan ambientes específicos. Por otro lado, dado que cada uno de los centros está compuesto por algunas especies compartidas con otros centros pero también por especies endémicas, se espera encontrar una alta variabilidad genética tanto dentro como entre ellos.

En este Capítulo, se analizan la región trnS-trnG de ADNcp en 96 muestras pertenecientes a 17 especies de la sección *Notolathyrus* que se distribuyen en la mayor parte del área de la sección, con los siguientes objetivos:

Objetivo general

Estimar la variabilidad de ADNcp existente en la sección *Notolathyrus* a nivel intra e interespecífico.

Objetivos específicos

1- Estudiar los patrones de variación genética mediante el uso de la región trnS-trnG de ADNcp en las especies de *Notolathyrus*.

2- Analizar si los centros de riqueza específica se corresponden con centros de diversidad genética.

3- Comprobar la monofilia del grupo incorporando toda la variabilidad encontrada en la sección.

4- Inferir las relaciones filogenéticas existentes a nivel intraespecífico.

Hipótesis

1- Las especies de *Notolathyrus* con una amplia distribución geográfica presentan mayor variabilidad del ADNcp que aquellas especies con una distribución geográfica restringida.

2- Los centros de riqueza específica propuestos para *Notolathyrus* son centros de diversidad genética.

3- La incorporación de todas las variantes haplotípicas aisladas de especies de la sección *Notolathyrus* sigue revelando a las especies sudamericanas como un grupo monofilético

4- Muestras de individuos co-específicos provenientes de localidades más cercanas están más emparentadas filogenéticamente que las de individuos co-específicos que provienen de localidades más distantes.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los análisis de variabilidad de ADNcp se llevaron a cabo a partir de 96 muestras pertenecientes a 17 especies de la sección *Notolathyrus* (Tabla 17). El detalle de colección y de la procedencia de los materiales de las distintas especies, variedades y poblaciones estudiadas se detalla en la Tabla 1. De acuerdo a la disponibilidad del material se incorporaron desde 2 a 25 individuos por especie, cada una de ellas proveniente de distintas localidades geográficas (Fig. 25), maximizando de esta manera el rango de variabilidad ecológica y geográfica de las muestras. Se muestreó con mayor intensidad aquellas especies que presentan mayor distribución geográfica y amplitud ecológica. Se adoptó este criterio debido a que en un ensayo preliminar tomando tres individuos de cinco localidades diferentes, se evidenció que las poblaciones analizadas eran monomórficas pero que existe una alta variabilidad interpoblacional. Para el análisis filogenético que se realiza en este Capítulo se tomaron los mismos grupos externos que en el Capítulo IV (Tabla 13, Capítulo IV).

Los métodos para la obtención de las secuencias y los criterios seguidos para la construcción de los árboles filogenéticos se detalla en el Capítulo IV. Para el análisis de las secuencias se determinó el número de sitios polimórficos (S), el número de sitios parsimoniosamente informativos (PI), la diversidad nucleotídica (π) y la diversidad haplotípica (h) utilizando el programa DNAsp 4.50.3 (Rozas *et al.* 2003).

La variabilidad genética existente entre y dentro de las especies, así como entre y dentro de los centros de riqueza específica se calculó mediante el análisis de la varianza molecular, AMOVA, (Excoffier *et al.* 1992) utilizando el programa Arlequin 3.0 (Schneider *et al.* 1991). Debido a que algunas especies se distribuyen en más de un centro de variabilidad específica, el AMOVA no se realizó considerando las especies dentro de cada centro de riqueza específica. El índice de fijación de las variantes haplotípicas se estimó mediante el estadístico Φ_{ST} .

Tabla 17. Listado del material de las especies de *Lathyrus* estudiadas y de los haplotipos encontrados. El código hace referencia a la localidad de la especie estudiada cuyo detalle se encuentra en la Tabla 1. Los haplotipos fueron representados con una letra y un número como subíndice. Los centros de riqueza específica se indican con las siglas **CRPU**: cuencas de los ríos Paraná y Uruguay, **SBUB**: sierras de Buenos Aires, Uruguay y sur de Brasil, **SSAC**: sierras subandinas y cordobesas y **BP**: bosques patagónicos.

Especies y Códigos	Haplotipos	Centro
<i>L. cabrerianus</i>		
1	A ₁	BP
<i>L. crassipes</i>		
2	B ₁	CRPU
3	B ₂	CRPU
4	Be ₃	SBUB
5	Be ₃	CRPU
6	Be ₃	SBUB
7	Be ₃	SBUB
8	B ₄	SBUB
9	B ₅	SBUB
10	B ₄	SBUB
11	B ₄	SBUB
<i>L. hasslerianus</i>		
12	C ₁	CRPU
13	C ₂	CRPU
<i>L. linearifolius</i>		
14	D ₁	CRPU
<i>L. macropus</i>		
15	EG ₁	SSAC
16	E ₂	SSAC
17	E ₃	SSAC
18	E ₄	SSAC
19	E ₅	SSAC
20	E ₆	SSAC

Continuación de la Tabla 17.

Especies y Códigos	Haplotipos	Centro
<i>L. macropus</i>		
21	EH₇	SSAC
23	BE₃	SSAC
24	E₈	SSAC
25	E₆	SSAC
26	E₉	SSAC
27	Eh₇	SSAC
<i>L. macrosatchys</i>		
28	F₁	CRPU
29	F₂	CRPU
<i>L. magellanicus var. glauscegens</i>		
30	G₁	BP
31	G₂	-
32	G₃	-
33	G₂	-
34	G₂	BP
35	G₄	BP
36	G₂	BP
37	G₅	BP
38	G₃	BP
<i>L. magellanicus var. magellanicus</i>		
39	G₆	BP
<i>L. magellanicus var. tucumanensis</i>		
41	G₇	SSAC
42	EG₁	
<i>L. multiceps</i>		
44	Eh₇	BP
45	Eh₇	BP
46	H₁	BP
47	Eh₇	BP

Continuación de la Tabla 17.

Especies y Códigos	Haplotipos	Centro
<i>L. multiceps</i>		
48	H₁	BP
<i>L. nervosus</i>		
49	I₁	SBUB
50	I₂	BP
51	I₃	BP
52	I₂	BP
53	I₄	SBUB
54	I₅	SBUB
55	I₅	SBUB
57	I₆	SBUB
58	I₇	SBUB
59	I₈	SBUB
61	I₆	SBUB
63	I₆	SBUB
<i>L. nigrivalvis</i>		
64	J₁	CRPU
<i>L. nitens</i>		
65	K₁	SBUB
<i>L. paranensis</i>		
67	L₁	SBUB
<i>L. pubescens</i>		
70	M₁	SBUB
71	M₂	SBUB
72	M₃	SBUB
73	M₄	SSAC
74	M₅	SSAC
75	M₆	SBUB
76	M₇	CRPU
77	M₈	SSAC

Continuación de la Tabla 17.

Especies y Códigos	Haplotipos	Centro
<i>L. pubescens</i>		
78	M₈	SSAC
79	M₉	SSAC
80	M₁₀	-
81	M₁₁	SBUB
82	M₁₂	SBUB
83	M₁₃	SBUB
84	M₁₄	SBUB
85	M₁₅	SBUB
86	M₁₆	SBUB
87	M₉	SBUB
88	M₁₇	SBUB
89	M₁₈	SBUB
90	M₁₇	SBUB
91	M₁₉	SBUB
92	M₂	SBUB
93	M₁₇	SBUB
94	M₂₀	-
<i>L. subandinus</i>		
95	N₁	-
<i>L. subulatus</i>		
96	O₁	CRPU
97	O₂	SBUB
98	O₃	SBUB
99	O₄	SBUB
100	O₅	SBUB
101	O₄	SBUB
102	O₆	SBUB
103	O₃	SBUB

Continuación de la Tabla 17.

Especies y Códigos	Haplotipos	Centro
<i>L. tomentosus</i>		
104	P₁	SBUB
<i>L. tropicalandinus</i>		
105	Q₁	-

RESULTADOS

Variabilidad del ADNcp

El tamaño de la región cloroplástica fue uniforme (800 pb) en todas las especies analizadas, excepto en *L. pubescens* que presentó cuatro tamaños distintos de bandas en las diferentes muestras analizadas (Fig. 26).

Una vez realizada la edición de las secuencias, considerando todos los indels, se obtuvo un alineamiento de 1453 pb. La remoción de los indels que comprendían regiones ricas en adenina o timina redujo la longitud del alineamiento final a 1372 pb. Para las 96 muestras de *Notolathyrus* estudiadas, se identificaron 68 haplotipos (Tabla 17). Estos haplotipos se codificaron utilizando una letra por especie y los diferentes haplotipos dentro de cada especie se identificaron con diferentes números (ejemplo B₁, B₂, etc. para los haplotipos de *L. crassipes*). Para el caso de haplotipos compartidos, se identificaron con las letras correspondientes a cada especie (la segunda en minúscula) y el número correspondió a la serie de la especie en que se identificó por primera vez (**Be₃**, haplotipo compartido por *L. crassipes* y *L. macropus*). La distribución geográfica de los haplotipos se representa en la Fig. 27. Los haplotipos fueron definidos por 192 sitios polimórficos o segregantes (S) de los cuales 93 sitios fueron parsimoniosamente informativos. Las mutaciones consistieron en sustituciones (transversiones y transiciones), translocaciones, duplicaciones, inserciones/deleciones en regiones no ricas en adenina timina y microinversiones. Cada una de estas fue tomada como un único evento mutacional. Para el total de las muestras se obtuvo una diversidad nucleotídica alta ($\pi = 0,015$) y una muy alta diversidad haplotípica ($h = 0,990$).

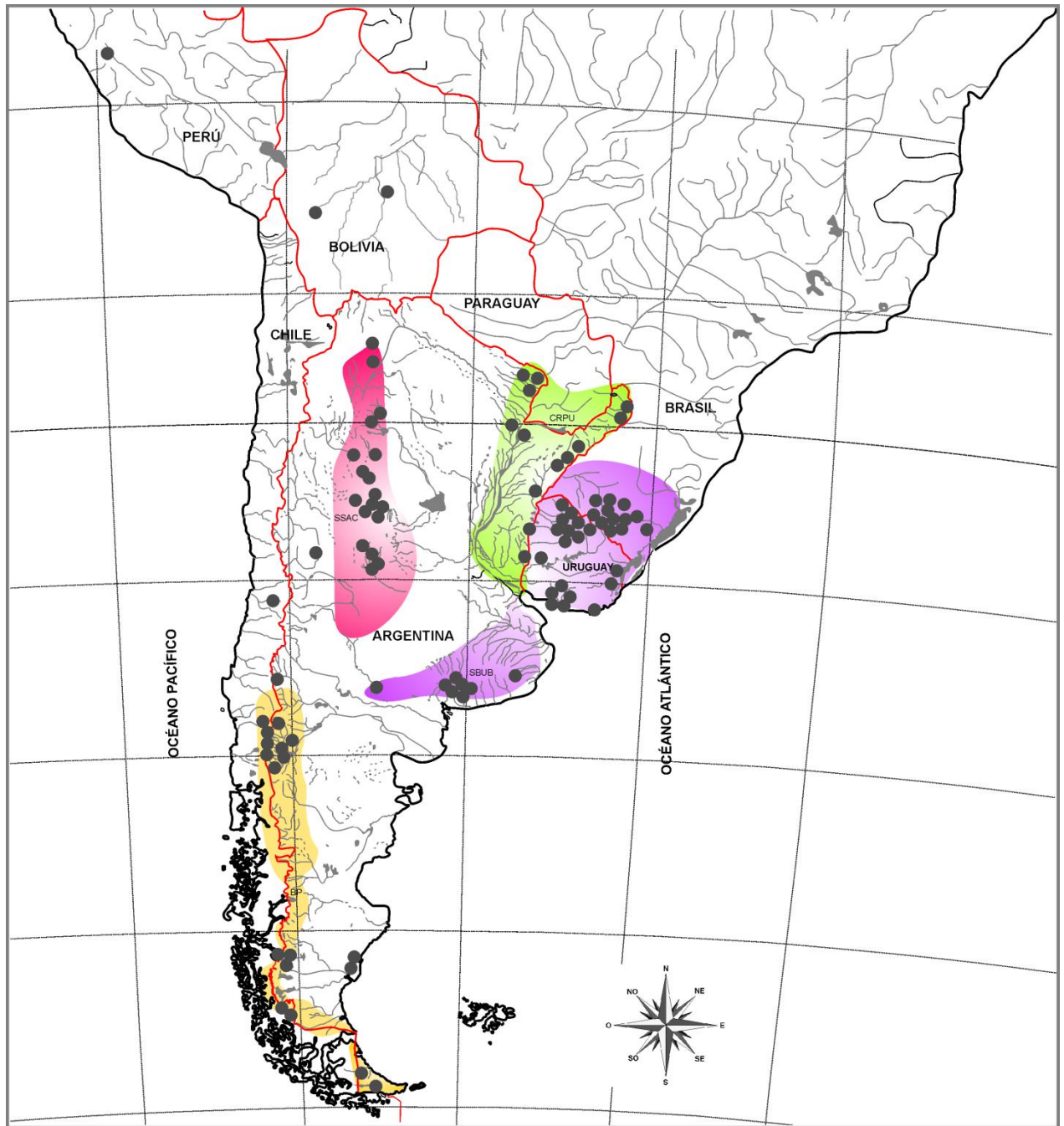


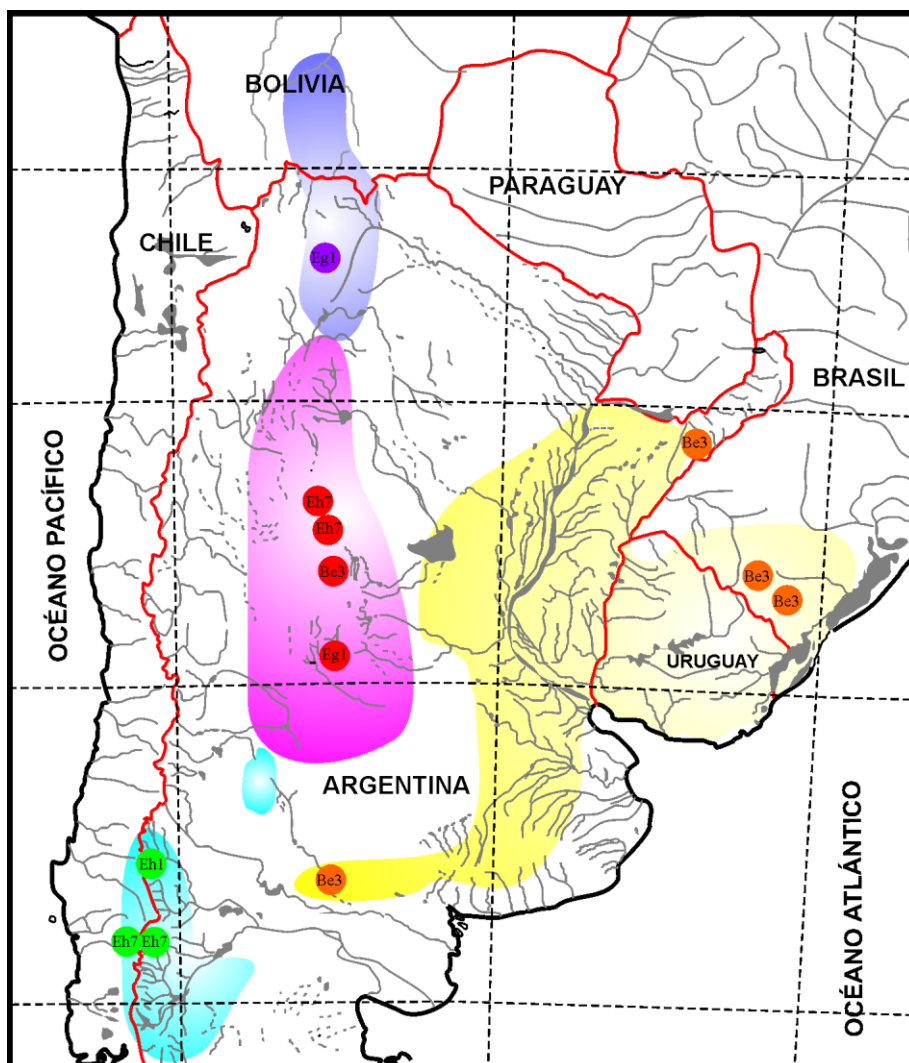
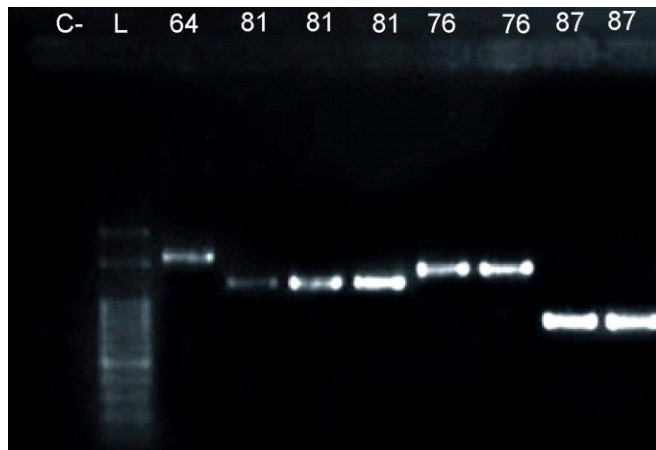
Figura 25. Mapa de las localidades de los individuos y los centros de riqueza específica estudiados de *Notolathyrus*. Los círculos en gris corresponden a las localidades analizadas. Las áreas coloreadas pertenecen a los centros de riqueza específica. En verde, CRPU; en lila SBUB; en amarillo, los BP y en rosado SSAC.

Los haplotipos más comunes fueron **Ae₃** y **Eh₇**, con cinco localidades cada uno, y **G₂** con cuatro, representando sólo el 14,43 % de la diversidad haplotípica. Los haplotipos restantes (73,53 % del total) fueron en su mayoría observados en una sola localidad. Asimismo, la

mayoría de los haplotipos fueron particulares de cada especie, independientemente del número de muestras analizadas. Se distinguieron sólo tres haplotipos compartidos entre especies, y en todos los casos, la especie que compartió haplotipos fue *L. macropus*: con *L. crassipes* (**Ae₃**), con *L. magellanicus* var. *tucumanensis* (**Eg₁**) y con *L. multiceps* (**Uh₇**) (Fig. 27).

Figura 26. Gel de la región trnS-trnG amplificada de *Lathyrus pubescens*. Cada calle pertenece a poblaciones diferentes indicadas con sus códigos. La primera calle pertenece al control negativo y la segunda al marcador de masas conocidas.

Figura 27. Mapa de las áreas de distribución de las especies con haplotipos compartidos. Las áreas coloreadas representan la distribución geográfica de cada una de las especies, según datos extraídos de Burkart (1935) y del análisis de material de herbario. En azul *L. magellanicus* var. *tucumanensis*, en violeta *L. macropus*, en amarillo *L. crassipes* y en celeste *L. multiceps*. Los círculos corresponden al sitio donde se encuentran los individuos con haplotipos compartidos.



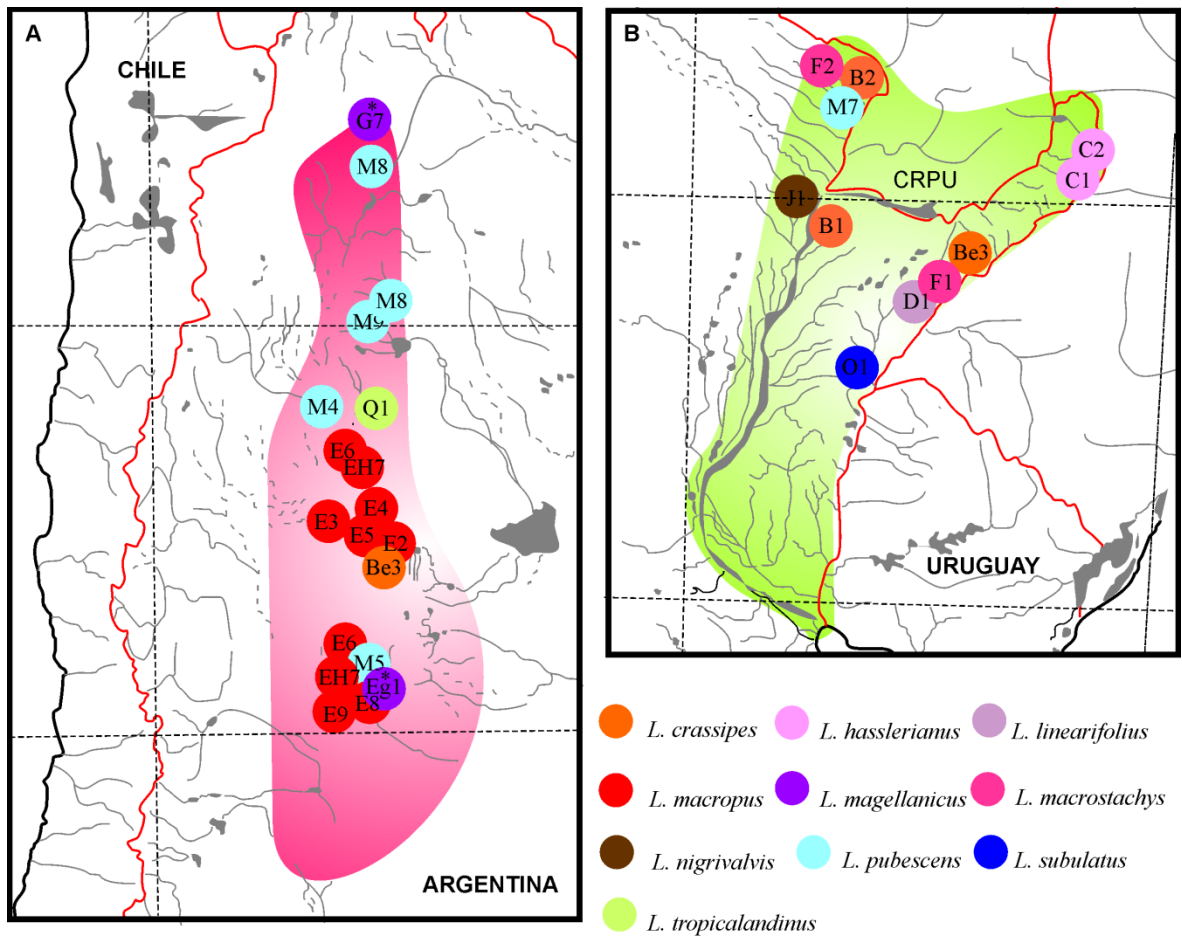


Figura 28. Mapas de los centros de riqueza específica de *Notolathyrus* indicando la distribución de los haplotipos observados. **A:** el área del centro sierras subandinas y cordobesas (SSAC) se indica en rosado, **B:** el área del centro cuenca de los ríos Paraná y Uruguay (CRPU) se indica en verde. Los círculos representan las localidades muestreadas, el color de los mismos a las distintas especies analizadas y cada uno de ellos lleva escrito el nombre del haplotipo detectado en esa localidad. Letras y números iguales representan el mismo haplotipo.

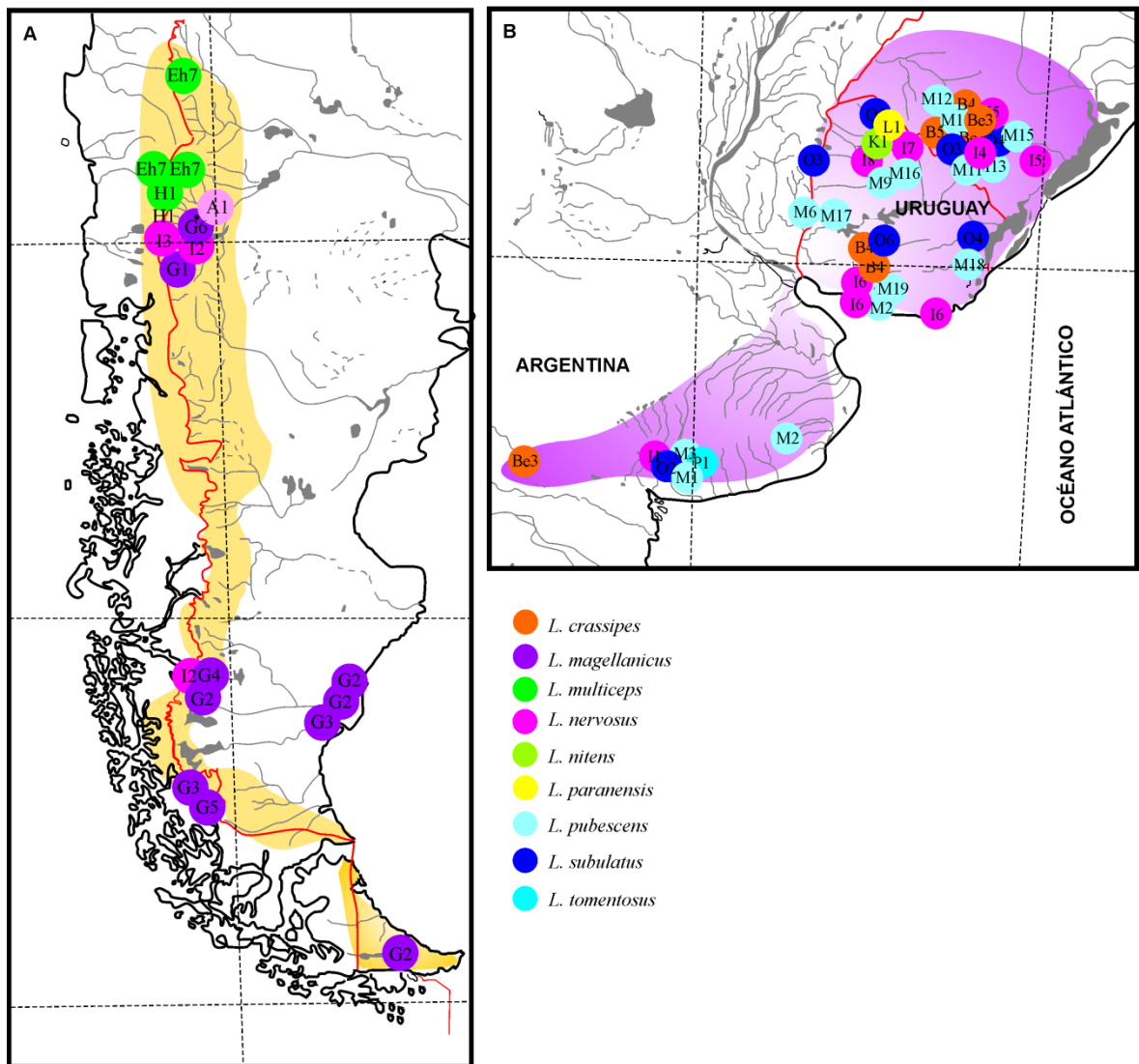


Figura 29. Mapas de los centros de riqueza específica de *Notolathyrus* indicando la distribución de los haplotipos observados. **A:** el área del centro bosques patagónicos (BP) se indica en amarillo, **B:** el área del centro sierras de Buenos Aires Uruguay y sur de Brasil (SBUB) se indica en lila. Los círculos representan las localidades muestreadas, el color de los mismos a las distintas especies analizadas y cada uno de ellos lleva escrito el nombre del haplotipo detectado en esa localidad. Letras y números iguales representan el mismo haplotipo.

Los valores de variabilidad intraespecífica obtenidos para las especies en las que se analizaron muestras provenientes de más de una localidad se presentan en la Tabla 18. Todas las especies, independientemente del tamaño de su área de distribución, mostraron una alta diversidad nucleotídica (0,003-0,011) y una alta o muy alta diversidad haplotípica (0,53-1). Las excepciones a esta regla fueron *L. crassipes* y *L. multiceps* que presentaron una diversidad haplotípica moderada de 0,53 y 0,6, respectivamente.

El análisis de la varianza molecular (AMOVA) reveló que el 56,02 % de la variabilidad total observada en el grupo corresponde a la existente entre las distintas especies y el 44,98 % a la existente dentro de las mismas ($\Phi_{ST} = 0,560$; $p = 0,002$). El análisis de la variabilidad haplotípica, a nivel de centros de diversidad específica mostró que todos los haplotipos presentes en cada centro, excepto tres, fueron exclusivos. El número de haplotipos por centro osciló entre 11 y 29 (Tabla 19 y Figs. 28 y 29). El centro con mayor diversidad haplotípica fue CRPU ($H_d = 1$) y el de menor diversidad haplotípica fue BP ($H_d = 0,848$). El AMOVA, teniendo en cuenta los tres centros de riqueza específica propuestos por Burkart (1935) y Seijo (2002) más el propuesto en este Capítulo, mostró que la variabilidad entre los centros sólo explica el 6,13 % de la variabilidad total y que el 93,87 % es explicado por la variabilidad observada dentro de ellos ($\Phi_{ST} = 0,0613$; $p = 0,000$).

Tabla 18. Estadísticos de diversidad genética hallada en la región trnS-trnG de ADNcp por especie. **Muestras:** número de localidades estudiadas, **pb:** número pares de bases obtenidos en el alineamiento de las secuencias por especie, **S:** número de sitios segregantes, **π :** diversidad nucleotídica, **n:** número de haplotipos, **h:** diversidad haplotípica. **A:** amplia, **R:** restringida.

Especie	Tipo de distribución	Muestras	pb	S	π	n	h
<i>L. crassipes</i>	A	10	790	15	0,0050 \pm 0,0002	5	0,5300 \pm 0,1800
<i>L. hasslerianus</i>	R	2	723	12	0,0080 \pm 0,0003	2	1,0000 \pm 0,0250
<i>L. macropus</i>	A	12	858	28	0,0080 \pm 0,0001	9	0,9400 \pm 0,0030
<i>L. macrostachys</i>	R	2	726	5	0,0006 \pm 0,0030	2	1,0000 \pm 0,0250
<i>L. magellanicus</i>	A	12	800	43	0,0100 \pm 0,0003	8	0,8000 \pm 0,1100
<i>L. multiceps</i>	R	5	722	2	0,0004 \pm 0,0001	2	0,6000 \pm 0,0030
<i>L. nervosus</i>	A	12	777	35	0,0090 \pm 0,0002	11	0,9600 \pm 0,0020
<i>L. pubescens</i>	A	25	134	132	0,0110 \pm 0,0002	23	0,9700 \pm 0,0180
<i>L. subulatus</i>	A	8	753	6	0,0030 \pm 0,0008	5	0,7900 \pm 0,1500

Tabla 19. Estadísticos de diversidad genética hallada en la región cloroplástica trnS-trnG por centros de riqueza específica. **loc.:** número de localidades estudiadas, **especies:** número de especies por centro, **pb:** pares de bases resultantes del alineamiento, **S:** número de sitios segregantes, **π :** diversidad nucleotídica, **n:** número de haplotipos, **h:** diversidad haplotípica.

Especie	loc	especies	pb	S	π	n	h
CRPU	11	7	741	52	0,01985	11	1,0000 \pm 0,00391
SBUB	43	7	1339	115	0,01641	29	0,9740 \pm 0,0002
SSAC	19	4	1357	25	0,00841	14	0,9650 \pm 0,0008
BP	23	5	723	60	0,01275	12	0,8660 \pm 0,0025

Relaciones filogenéticas

Las relaciones filogenéticas obtenidas a partir del análisis de las 96 muestras se presentan en la Figura 30. El árbol consenso fue obtenido siguiendo el criterio de la mayoría a partir de los 97 árboles más parsimoniosos y construidos en 468 pasos. Los árboles presentaron un índice de consistencia (IC) y de retención (IR) de 0,746 y de 0,910, respectivamente.

En el árbol, *Notolathyrus* se muestra como un grupo monofilético separado de todas las especies de otras secciones (BS = 100). Dentro del grupo de las especies sudamericanas, 24 de las 25 muestras analizadas de *L. pubescens* junto con la única muestra estudiada de *L. subandinus* formaron el clado **A** que se diferenció basalmente del resto de las especies de la sección (BS = 100). La otra muestra de *L. pubescens*, asociada con una de *L. macropus* y con la única muestra analizada de *L. tropicalandinus*, se diferenciaron en segunda instancia formando el clado **B** (BS 100 %). En el clado **C** (BS = 100), uno de los haplotipos de *L. macropus* se dispuso como hermano de un grupo politómico (BS = 100) integrado por las secuencias de nueve localidades (de las 11 analizadas) de *L. crassipes* y por otra de *L. macropus*.

El clado **D** reunió a todas las localidades restantes y presentó dos grandes subclados, **E** y **F**. El subclado **E**, agrupó a las secuencias de dos localidades de *L. crassipes* (las no incluidas en el clado **C**), siete localidades de *L. macropus* (de las 12 analizadas), ocho localidades de *L. subulatus* (de las nueve analizadas), a *L. magellanicus* de la localidad de Jujuy var. *tucumanensis*, a las muestras de todas las localidades analizadas de *L. hasslerianus* y *L. multiceps*, así como a las únicas muestras incluidas en este estudio de *L. tomentosus*, *L. cabrerianus*, *L. linearifolius*, *L. paranensis* y *L. nitens*. Este subclado presentó muchas politomías, aunque pueden distinguirse tres grupos principales. El primero de ellos fue el más diverso e incluyó a las localidades de *L. crassipes* (9 y 3), a dos de *L. macropus* (19 y 15) y a *L. tomentosus*, *L. magellanicus* var. *tucumanensis*, *L. linearifolius* y *L. nitens*. El segundo grupo quedó conformado mayoritariamente por las muestras de *L. multiceps* pero también incluyó a dos localidades de *L. macropus* (26 y 21), una de *L. hasslerianus* y a *L. cabrerianus*. El tercer grupo quedó integrado mayoritariamente por las muestras de *L. subulatus* e incluyó también una muestra de *L. magellanicus* var. *glauscecens* (29) y a *L. paranensis*.

Las dos localidades estudiadas de *L. hasslerianus* son muy cercanas geográficamente, sin embargo, quedaron separadas dentro del subclado **E**. Las localidades de *L. multiceps* se separaron en dos grupos, uno formado por dos localidades que presentaron los haplotipos

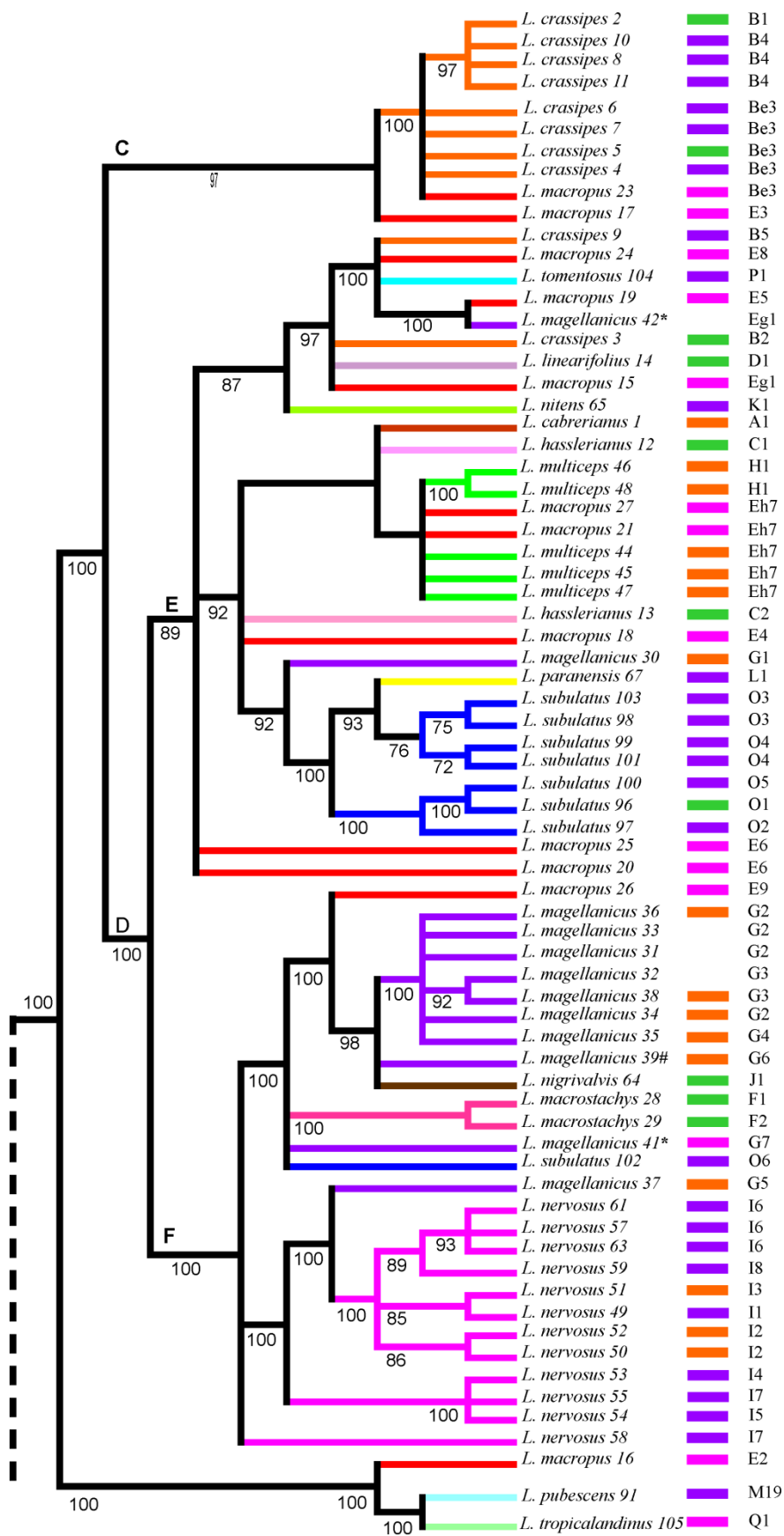
exclusivos de la especie, y el otro grupo, con haplotipos compartidos con *L. macropus*. Las localidades de *L. subulatus* se dispusieron en dos subgrupos, uno de ellos también incluyó a *L. paranensis*.

El subclado **F** reunió a las muestras de dos localidades de *L. macropus*, a una localidad de *L. subulatus* (la única no incluida en el subclado **E**), a *L. magellanicus* var. *tucumanensis* de Bolivia y a todas las localidades analizadas de *L. nervosus*, *L. nigrivalvis*, *L. macrostachys* y *L. magellanicus* var. *glauscegens* y *L. magellanicus* var. *magellanicus*. Dentro de este subclado se distinguieron los grupos **4** y **5**. En el primer grupo (**4**) se asociaron, en una politomía basal, una localidad de *L. subulatus* (94), una de *L. magellanicus* var. *tucumanensis* (39*), las dos de *L. macrostachys* y un subgrupo conformado mayoritariamente por las localidades de *L. magellanicus* var. *glauscegens*, pero también por *L. nigrivalvis*, *L. magellanicus* var. *magellanicus* y una localidad de *L. macropus*. En el grupo 5 se incluyeron todas las localidades de *L. nervosus* y una de *L. magellanicus* var. *glauscegens*. Dentro de ese grupo, las muestras de *L. nervosus* se dispusieron en subgrupos consistentes con la distribución geográfica de las mismas.

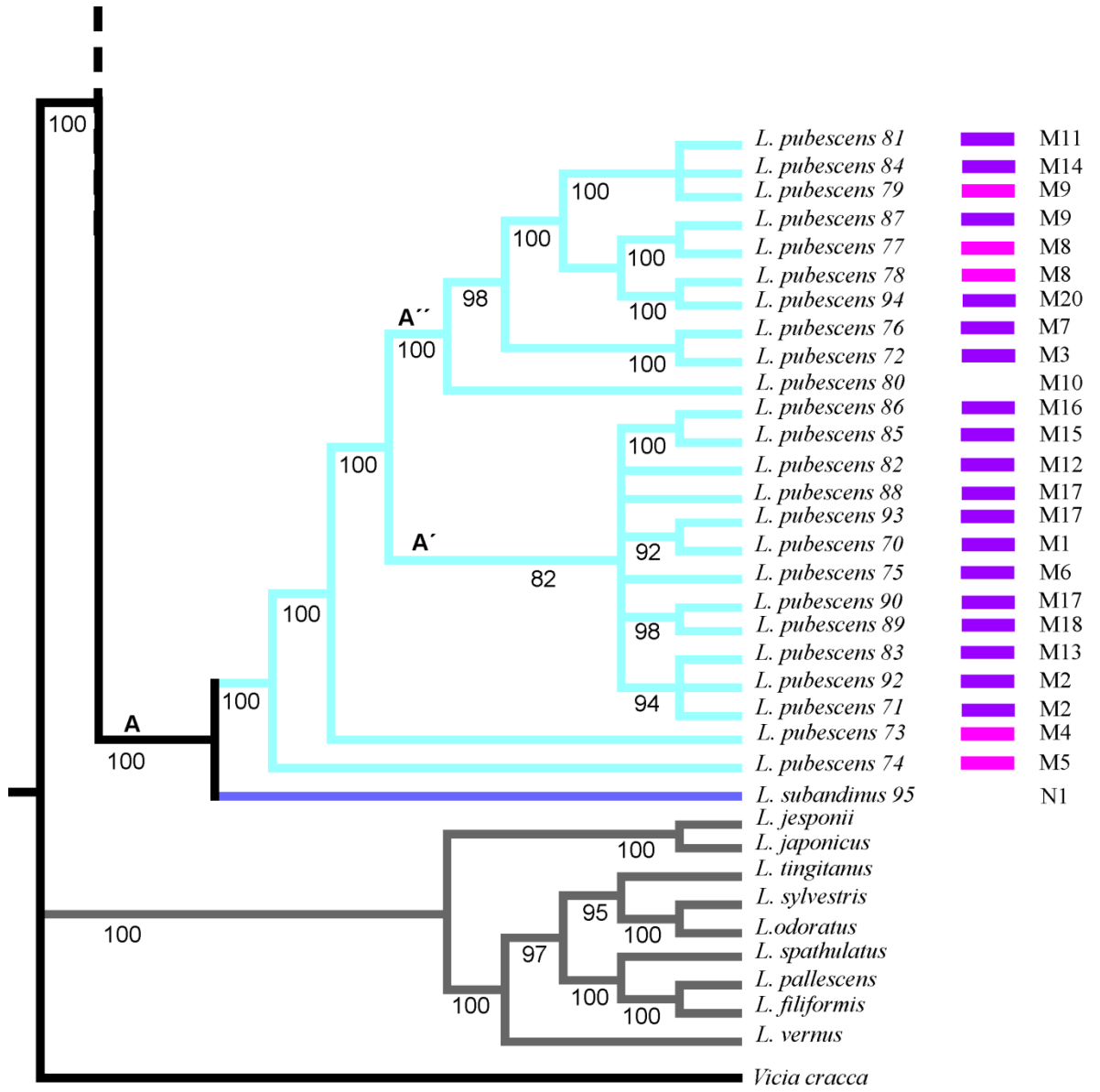
Los agrupamientos formados muestraron que la mayoría de las localidades de una misma especie tendieron a quedar agrupados. La única excepción fue *L. macropus*, cuyas muestras aparecieron dispersas en muchos de los clados de la sección *Notolathyrus*.

En general, las muestras incluidas en cada uno de los agrupamientos observados en el árbol mostraron una pobre asociación entre las relaciones filogenéticas y los centros de proveniencia de las muestras. En general, cada agrupamiento quedó integrado por muestras que provenían de más de un centro de riqueza específica.

Figura 30. Árbol consenso obtenido a partir de 98 árboles más parsimoniosos siguiendo el criterio de la mayoría. Los colores de las ramas representan a las diferentes especies. El número que acompaña al nombre de las especies es el código de la localidad a la que pertenece la secuencia representada en la Tabla 1. Para *Lathyrus magellanicus* la variedad *tucumanensis* se representa con asterisco (*), la variedad *magellanicus* con numeral (#) y la variedad *glauscegens* no lleva distinción. Las barras de colores al lado de cada terminal del árbol hacen referencia a los centros de riqueza específica en donde se encuentra esa localidad, CRPU en verde, SBUB en violeta, SSAC en rosado y BP en rojo. Los códigos de los haplotipos se encuentran a la derecha de las barras que indican los centros. Los valores de *bootstrap* > 50 % se indican debajo de las ramas.



Continúa en la siguiente página.



DISCUSIÓN

El análisis de la región espaciadora trnS-trnG de ADNcp mostró un elevado número de polimorfismos con una alta reproducibilidad, permitiendo realizar estudios de variabilidad genética a nivel intra e interespecífico. Los análisis realizados en este Capítulo representan un estudio de base que permitió dimensionar la variabilidad existente tanto entre y dentro de las especies, como entre y dentro de los centros de riqueza específica de *Notolathyrus*. Asimismo, permitió realizar algunas inferencias sobre la historia evolutiva del grupo.

Variabilidad del ADNcp

Los valores de variabilidad genética (haplotípica y nucleotídica) encontrados en la región de ADNcp analizada para las especies de *Notolathyrus* son relativamente altos, tanto a nivel interespecífico como intraespecífico, comparados con otros grupos de especies de plantas (Gernandt *et al.* 2003, 2005, Montufar y Pintaud 2008). Esta gran variabilidad genética fue observada también en especies pertenecientes a otras secciones (Kenicer *et al.* 2005, Belaïd *et al.* 2006) y en géneros emparentados a *Lathyrus* como *Pisum* (Smýkal *et al.* 2010).

En general, se asume que el hallazgo de una elevada variabilidad nucleotídica en conjunto con una elevada variabilidad haplotípica es un indicador de poblaciones con un N_e grande que han permanecido estables, por largos períodos de tiempo. Alternativamente, estas características podrían corresponder a una muestra resultante de una mezcla de individuos provenientes de poblaciones separadas históricamente por largos periodos de tiempo (Avice 2000). Para el caso de *Notolathyrus*, la segunda hipótesis es la interpretación más apropiada se podría interpretar más apropiadamente según la segunda opción, ya que para cada especie se tomaron individuos de distintas poblaciones, que probablemente han estado aisladas por mucho tiempo.

El hecho de que cada especie presente un conjunto de haplotipos particulares y que los haplotipos detectados dentro de cada especie tiendan a estar más relacionados entre sí que con otras especies sugiere que la mayor parte de la variabilidad observada se habría generado con posterioridad a la diversificación específica de *Notolathyrus*. Por otra parte, la alta variabilidad no compartida dentro de cada especie sugiere que la diversificación del grupo no sería reciente.

El hecho de que *L. macropus* sea la única especie que presenta haplotipos compartidos con *L. magellanicus* var. *tucumanensis*, *L. multiceps* y *L. crassipes* podría interpretarse

como el resultado de eventos de captura cloroplástica o bien que *L. macropus* conserva parte del polimorfismo ancestral existente en la sección. La captura cloroplástica ha sido propuesta en grupos en los que las distintas especies comparten frecuentemente haplotipos de ADNcp, tales como *Eucalyptus* (Mc Kinnon *et al.* 2001, 2004), *Packera* (Bain y Jansen 1996, Golden y Bain 2000) y *Lithocarpus* (Cannon y Manos 2003). Estos grupos se caracterizan porque las especies presentan barreras reproductivas interespecíficas pobremente desarrolladas con altos niveles de hibridación e introgresión (Riesberg y Soltis 1991, Riesberg *et al.* 1996). Sin embargo, como se señaló en el Capítulo IV, en todos los estudios de hibridación artificial realizados en *Lathyrus* se han evidenciado fuertes barreras reproductivas (Hammet *et al.* 1994, Nandini *et al.* 1999), y hasta el momento no se han registrado híbridos interespecíficos en la naturaleza dentro de la sección Notolathyrus. En consecuencia, la hipótesis de captura cloroplástica para explicar los haplotipos compartidos observados entre *L. macropus* y otras especies resulta improbable.

La interpretación de los haplotipos compartidos existentes en *L. macropus* como un remanente de polimorfismo ancestral, en cierta forma, es concordante con la retención de caracteres morfológicos ancestrales en esta especie. Desde un punto de vista morfológico, *L. macropus* es la única especie que presenta hojas con varios pares de folíolos, estado que se considera ancestral comparado con el de hojas uniyugas (Kupicha 1983).

En numerosas especies y grupos de plantas se ha demostrado que existe una correlación positiva entre la amplitud del rango de distribución geográfica y la diversidad genética de las especies (Hamrick y Godt 1989, Hamrick *et al.* 1992, Templeton 1998, Byrne *et al.* 2002). Sin embargo, en Notolathyrus, tanto las especies con amplia distribución geográfica como las de distribución restringida presentaron una alta diversidad haplotípica. Es decir, que la amplitud de la distribución geográfica de las especies no se correlaciona en forma directa con la diversidad genética (haplotípica y nucleotídica) en dicha sección. La ocurrencia de diversidad haplotípica similares en especies con diferentes tamaños de área geográfica ha sido interpretada considerando que las actuales poblaciones de las especies con distribución restringida podrían constituir un relictos de una especie con mayor distribución en el pasado como ocurre en *Podocarpus parlatorei* y *P. nubigena* (Quiroga 2009). En este sentido, los altos valores de variación genética detectados en las dos especies con distribución restringida (*L. macrostachys* y *L. hasslerianus*) podrían haber resultado de las fluctuaciones en los tamaños poblacionales y áreas de distribución que han de la distribución históricas. En tal sentido, tanto *L. hasslerianus* como *L. macrostachys* habitan actualmente en áreas marginales para la sección y están entre las especies que

presentan mayor diferenciación en cuanto a preferencia de hábitats *L. hasslerianus* es la única que actualmente vive en la selva Paranaense y *L. macrostachys* es la única que habita en ambientes paludícolas de los campos paranaenses subtropicales (Burkart 1935, 1942, Seijo 2002). Esta especificidad de ambientes, para un género netamente adaptado a climas templados y fríos, constituye probablemente una evidencia de cómo los cambios climáticos en el pasado han modelado la distribución geográfica de las especies en el presente. La distribución geográfica de estas especies, la demografía de sus poblaciones y la variabilidad haplotípica encontrada probablemente puedan ser explicadas como un relictos del avance y retroceso existente entre los biomas Pampa y selva Paranaense, durante los ciclos glaciares (Iriando y García 1993, Iriando 1999). El bioma Pampa se extendía hacia el norte durante los periodos glaciares favoreciendo quizás, la extensión de *Lathyrus* hacia el noreste, mientras que durante los periodos interglaciares la selva Paranaense se extendía hacia el sur favoreciendo a las especies mesofíticas. La tensión de ambos biomas en el área de distribución de *L. hasslerianus* y *L. macrostachys* posiblemente habría determinado cuellos de botella y expansiones sucesivas. La deriva genética, ocurrida durante los cuellos de botella, habría llevado a la fijación de haplotipos diferentes en las distintas poblaciones de una misma especie.

Teniendo en cuenta las seis especies de *Notolathyrus* con amplia distribución estudiadas, la mayor diversidad haplotípica y nucleotídica la presentaron *Lathyrus pubescens*, *L. nervosus* y *L. macropus*. Estas especies, además de presentar un amplio rango geográfico, incluyen una mayor diversidad de nichos ecológicos, en comparación con las otras tres especies de amplia distribución analizadas, *L. crassipes*, *L. magellanicus* y *L. subulatus*. *Lathyrus crassipes* es la especie con menor diversidad haplotípica y nucleotídica en comparación al resto de las especies con amplia distribución. Esto podría estar relacionado con su sistema genético, debido a que esta especie es anual y autógena, mientras que las demás especies son perennes y con algún grado de alogamia. La autogamia podría estar afectando a esta especie disminuyendo la variabilidad genética existente, tal como ocurre en otros grupos de plantas (Hamrick y Godt 1989, Shapcott 1991, Gibson *et al.* 1995).

El AMOVA realizado para los centros de riqueza específica mostró que la variabilidad genética existente en la sección se explica principalmente por la variabilidad existente dentro de dichos centros. Estos resultados evidencian que los cuatro centros de riqueza específica propuestos también son centros de diversidad genética.

Las diferencias en la variabilidad haplotípica encontrada entre los centros (CRPU, SBUB, SSAC y BP) podrían ser explicadas por cambios geológicos y climáticos ocurridos en la región, durante el Cuaternario. Aunque las glaciaciones afectaron a toda Sudamérica, lo hicieron de diferentes maneras en las distintas regiones. Los cambios climáticos en el centro de Sudamérica, donde se encuentran los centros CRPU, SBUB y SSAC incluyeron cambios cíclicos modestos de temperatura pero severos en cuanto a regimenes pluviométricos, contrariamente a lo ocurrido en la región sur donde se encuentra el centro BP (Iriondo 1999, Iriondo y Gracia 1993). En la zona central, durante las fases de frío seco, las zonas montañosas incluidas dentro de los centros CRPU, SBUB y SSAC han sido propuestas como zonas de refugio (Vuilleumier 1971, Haffer 1982, Grela 2004). Este hecho, habría implicado la fragmentación de la flora templada en múltiples refugios con la consecuente reducción de los tamaños poblacionales de las especies de *Lathyrus* y subsecuente fijación de diferentes haplotipos en las distintas poblaciones. Por otro lado, hacia el Norte de la región central de Sudamérica en los periodos fríos y secos el bioma Pampa habría extendido su área permitiendo la expansión de los taxones de *Notolathyrus* hacia el norte. En los periodos cálidos y húmedos la selva Paranaense habría avanzado hacia el sur fragmentando la flora templada que acompañó la expansión del bioma Pampa hacia el norte. Este proceso también habría implicado la reducción de las poblaciones de *Lathyrus* con la fijación de haplotipos (tal como se mencionó para *L. macrostachys* y *L. hasslerianus*).

La menor diversidad genética observada en el centro BP podría explicarse a partir de la mayor severidad con que se dieron los cambios climáticos (periodos glaciares) durante el Cuaternario (Colinvaux *et al.* 2000, Quiroga y Premoli 2007), que no sólo llevaron a la reducción de los tamaños poblacionales sino que habrían determinado la extinción de muchas o la mayoría de ellas. Las áreas donde ocurrieron las extinciones habrían sido recolonizadas en periodos interglaciares a partir de las poblaciones remanentes en los refugios con variantes haplotípicas fijadas. Según esta hipótesis se espera que los taxones que han sufrido este proceso presenten una variabilidad haplotípica reducida y, en general, con unos pocos haplotipos compartidos por todas las poblaciones que los componen. El taxón que más se ajusta a este modelo es *L. magellanicus* var. *gluscegens*, que es el que presenta la distribución más austral, y que por ende habría estado expuesto a condiciones más extremas. A diferencia de las especies pertenecientes a otros centros, en la que la mayoría presentaron haplotipos particulares para cada una de las poblaciones, en *L. magellanicus* var. *gluscegens* de las nueve poblaciones analizadas cuatro presentaron el

haplotipo **G₂** y dos el haplotipo **G₃**. Por otra parte, la mayor diversidad de haplotipos de este taxón se encontró en los bosques cordilleranos, coincidiendo con el área propuesta como refugio para diferentes taxones dentro de dicha región (Villagran 2001, Mathiasen y Premoli 2010). El hecho de que todas las poblaciones de la costa atlántica presenten un mismo haplotipo (**G₂**) y que ésta sea la región que se ha desglaciado más tardíamente (Clapperton 1993) sustentaría la hipótesis que las poblaciones de la costa se habrían originado a partir de recolonización por individuos (**G₂**) provenientes de los refugios cordilleranos. La otra especie que podría ajustarse a esta hipótesis es *L. multiceps*, que también se distribuye en el centro bosques patagónico. Si bien sólo se han estudiado cinco poblaciones se han detectado únicamente dos haplotipos, por lo que el nivel de haplotipos compartidos entre las poblaciones de este taxón es mucho mayor que el observado en especies de otros centros.

Relaciones filogenéticas

Se ha propuesto que para obtener la hipótesis evolutiva más confiable, las inferencias filogenéticas a nivel genérico o entre especies estrechamente relacionadas debe tenerse en cuenta a la variabilidad intraespecífica existente en los grupos (Widmer y Baltisberger 1999). Siguiendo esta premisa y debido a la gran variabilidad de las especies de *Notolathyrus*, en este Capítulo se puso a prueba la robustez de la monofilia del grupo observada en el Capítulo anterior. La incorporación de las secuencias de todas las localidades de las especies de *Notolathyrus* analizadas evidenció que la sección se mantuvo como un grupo monofilético (BS = 100). Es decir que, aunque todas las especies sudamericanas de *Lathyrus* presentan caracteres morfológicos comunes con otras especies de otras secciones del género, como *Lathyrostylis*, *Clymenum* y *Orobus* (Kupicha 1983), los resultados evidencian que todas ellas presentan un ancestro común más reciente que con otras especies de *Lathyrus* pertenecientes a otras secciones.

Si bien la monofilia de *Notolathyrus* se mantiene luego de incorporar al análisis la variabilidad intraespecífica, las relaciones entre algunas de las especies del grupo no fueron exactamente iguales a las relaciones filogenéticas observadas en el árbol generado (en el Capítulo IV) en el que se consideraron las secuencias de un sólo individuo por taxón. Por ejemplo, en el árbol filogenético de ADNcp, construido en el Capítulo IV *L. pubescens* se presentó en una politomía dentro del clado derivado **B**. Sin embargo, al considerar toda la variabilidad del grupo, *L. pubescens* se ubicó en posición basal. La posición de esta especie

en una posición basal en el árbol filogenético es concordante con su amplia distribución geográfica (Burkart 1935) y con la gran variabilidad genética que presenta.

La posición basal de *Lathyrus tropicalandinus* es consistente en los árboles construidos en los Capítulos IV y V. Por otra parte, la inclusión de la especie chilena, *L. subandinus*, en el subclado que agrupa a la mayoría de las localidades estudiadas de *L. pubescens* observadas en este Capítulo, es congruente con el agrupamiento observado en el Capítulo IV de esta tesis ya que ambas especies quedaron incluidas en grupos hermanos dentro del clado **B**. Ambas especies son morfológicamente afines y sólo se distinguen por las inflorescencias y la estructura de la vaina madura (Burkart 1935). *Lathyrus subandinus* es endémica de Chile y presenta una distribución muy restringida a diferencia de *L. pubescens* que presenta una amplia distribución.

Con respecto a las demás especies, *Lathyrus crassipes* se desprende tempranamente de las restantes especies de la sección, situación que también se observó en el Capítulo anterior. Los agrupamientos de las especies incluidas en los subclados **A** y **B** del Capítulo anterior se mantienen, en general, en los subclados **F** y **E**, respectivamente del árbol construido en este Capítulo (excepto una localidad de *L. magellanicus* var. *glausecens* y las localidades de *L. macropus* que están dispersas por todo el árbol). Las excepciones están dadas por *L. paranensis* que deja de integrar el clado con frutos negros y se asocia con el grupo de los frutos castaños y por *L. subandinus* y *L. pubescens* que salen del clado de frutos castaños y se asocian en un clado basal junto con *L. tropicalandinus*.

Si bien la secuencia de ADNcp fue parcialmente informativa para el establecimiento de las relaciones interespecíficas, a nivel intraespecífico la mayoría de los agrupamientos generaron amplias politomías impidiendo el establecimiento de relaciones entre las muestras de diferentes localidades. En las únicas especies en donde las relaciones entre localidades quedaron mejor resueltas fueron *L. pubescens*, *L. nervosus* y *L. subulatus*. Sin embargo, los agrupamientos filogenéticos obtenidos, en la mayoría de los casos, no son congruentes con las procedencias geográficas de las muestras.

En general, los resultados obtenidos en este Capítulo evidencian que teniendo en cuenta toda la variabilidad, incluyendo a los indels, permiten una mejor resolución filogenética de la sección *Notolathyrus* como ocurre en muchos otros grupos de plantas (Golenberg *et al.* 1993, Kelchner y Clark 1997, Kelchner 2000).

Patrones de variabilidad haplotípica y nucleotídica

En cuanto al origen de la sección *Notolathyrus* en relación con los patrones de variabilidad haplotípica y nucleotídica observada, bajo la hipótesis de que las especies sudamericanas de *Lathyrus* derivan de especies que habrían migrado desde América del Norte (Kupicha 1983, Burkart 1935) hacia América del Sur siguiendo los Sistemas serranos de la Cordillera de los Andes y Peripampásicos (Frengüeli 1950, De la Sota 1967, Speranza *et al.* 2007), se habría esperado encontrar una mayor variabilidad en los centros SSAC y BP y una menor en CRPU y SBUB. Por el contrario, los resultados obtenidos evidencian una mayor variabilidad en los centros CRPU y SBUB comparándolo con los centros SSAC y BP. Esta discordancia entre los datos observados con los esperados, bajo esta hipótesis, podría deberse a dos situaciones. Una de ellas es la reducción de la variabilidad genética en la región del centro SSAC como consecuencia de extinciones masivas en el noroeste y sur de Sudamérica debido a fuertes cambios climáticos durante el periodo Cuaternario, en contraposición a climas más estables en las zonas en donde se encuentran los centros CRPU y SBUB, lo cual explicaría la menor variabilidad encontrada en la región SSAC. La ancestralidad de *L. tropicalandinus* y *L. pubescens* observada en este Capítulo sustentaría este modelo biogeográfico y la hipótesis de migración de *Lathyrus* desde el norte hacia el sur del continente americano, a través del Istmo de Panamá (3 Ma atrás). Sin embargo, estos resultados no son consistentes con los datos filogenéticos generales ni con las similitudes morfológicas y cromosómicas establecidas en esta tesis que evidencian una mayor similitud de *Notolathyrus* con las especies del Mediterráneo.

La hipótesis alternativa que explicaría los patrones de variabilidad genética encontrados considera que las especies ancestrales de *Notolathyrus* derivan de especies europeas en consistencia con la propuesta de Simola (1968). Esta autora, sin considerar la teoría de la deriva continental ni datos sobre el tiempo en el que se pudo haber originado el género, propuso que dichas especies habrían colonizado Sudamérica antes que Gondwana se separara. Sin embargo, el tiempo estimativo en el cual habría surgido *Lathyrus* mediante datos moleculares es de 17 Ma (Levin *et al.* 2005), por lo tanto, el modo por el cual se habría originado *Notolathyrus* planteado por Simola es prácticamente imposible. Frente a esta controversia y a favor de que las especies de *Notolathyrus* derivan de las especies del Viejo Mundo, Kenicer *et al.* (2005) proponen una dispersión transoceánica, a través del Atlántico, mediante la deriva de las semillas. El patrón de variabilidad encontrado en este Capítulo es más compatible con una migración a distancia transatlántica y colonización

inicial de las Sierras de Buenos Aires, Uruguay y Brasil. Si bien, algunos autores suponen que la flora encontrada a ambos lados del Atlántico se explica por dispersión antes de que Gondwana se separe (Raven y Axelrod 1974, Gentry 1982) actualmente se reconoce la existencia de rutas importantes de dispersión interplaca (Morley 2003). Por otro lado, se ha propuesto que no es necesario recurrir en todos los casos a la dispersión de semillas a larga distancia debido a que aunque no haya evidencia inequívoca para conexiones terrestres continuas entre los continentes luego de su separación se ha planteado la hipótesis de migración a través de cadenas de islas (Morley 2000, 2003, Morley y Dick 2003). Por lo tanto, la hipótesis que plantea que las especies primitivas de *Lathyrus* se habrían dispersado desde Europa hacia Sudamérica por el Océano Atlántico dando origen por diversificación local a la sección *Notolathyrus* aparece al menos como probable. Por lo expuesto, para esclarecer el origen de la sección se necesitan de estudios multidisciplinarios mucho más amplios que incluyan análisis taxonómicos, biogeográficos y genéticos en *Notolathyrus* y en especies de América del Norte, África y Europa.

CONSIDERACIONES FINALES

CONSIDERACIONES FINALES

Las especies de *Notolathyrus* presentan cromosomas morfológicamente similares. El análisis de los patrones de bandas DAPI y de genes ribosomales 45S y 5S mediante hibridación *in situ* fluorescente, proveyeron nuevos marcadores cromosómicos que facilitaron la identificación inequívoca de la mayoría de los pares de cromosomas homólogos dentro de cada cariotipo. Además, la posición conservada de los *loci* 45S ADNr en los brazos largos del par más pequeño (subtelocéntrico) del complemento fue un carácter exclusivo de las especies sudamericanas. Por su parte, las bandas heterocromáticas presentaron un alto valor taxonómico a nivel interespecífico, ya que cada una de las 11 especies sudamericanas estudiadas presentó un patrón particular. La presencia de bandas heterocromáticas centroméricas DAPI⁺ en todos o en la mayoría de los cromosomas de los complementos de todas las especies sugiere que éstas constituyen un carácter plesiomórfico dentro del género.

Las especies anuales de *Lathyrus* analizadas en esta tesis tienden a presentar menor contenido de ADN que las especies perennes. Considerando que las especies incluidas en la tribu Fabae han sufrido un significativo aumento del contenido de ADN con respecto al resto de las Papilionoideas, la reducción del contenido de ADN en la transición evolutiva de perennidad a anualidad dentro de *Lathyrus* evidenció la ocurrencia de cambios cíclicos en el contenido de ADN en la historia evolutiva del género. El análisis de los contenidos de ADN y de las longitudes cariotípicas de las especies reveló que la variación en el tamaño genómico ha sido uno de los cambios que ha tenido mayor relevancia durante la divergencia y evolución de los complementos cromosómicos en *Notolathyrus*. La falta de correspondencia entre el contenido de ADN y la cantidad de heterocromatina sugirió que

los cambios en el contenido de ADN en esta sección implicaron cambios en la cantidad de secuencias repetitivas, tanto en la fracción heterocromática como en la fracción eucromática.

El análisis de la cantidad de heterocromatina en función de la distribución geográfica de las especies evidenció que las especies subtropicales de *Notolathyrus* presentan valores más bajos de heterocromatina que aquellas que habitan en latitudes medias y altas. Considerando los ciclos de vida de las especies estudiadas, las especies anuales presentaron menor cantidad de heterocromatina en sus complementos que las perennes. Estos datos sugieren que la variación en la cantidad de heterocromatina debe tener valor adaptativo.

Los diferentes parámetros cariotípicos observados en esta tesis revelaron a *Notolathyrus* como un grupo homogéneo y diferente de la sección *Orobus*. Por otra parte, los patrones de bandeo y de contenido de ADN observados en la sección *Notolathyrus* fueron más similares a aquellos que presentan las especies del mediterráneo (sección *Lathyrus*, *Cicerula* y *Clymenum*). Estos datos sustentan la hipótesis que considera que las especies sudamericanas se originaron a partir de especies mediterráneas de *Lathyrus*

El análisis citogenético realizado en diversas poblaciones de *Lathyrus nervosus* reveló la existencia de variación intraespecífica, tanto en los niveles de ploidía como en los patrones de cantidad y distribución de la heterocromatina. La gran similitud de todos los parámetros cariotípicos analizados entre todos los complementos cromosómicos de los individuos poliploides (3x y 4x) sugirió un origen autopoliploide de los mismos. La detección de esporas y de granos de polen no reducidos en tres poblaciones de esta especie sugiere que la formación de estos tipos de granos no sería un evento raro y sustenta al modelo de poliploidización sexual como el mecanismo más probable de origen de los poliploides. El análisis de la meiosis permitió proponer a la ocurrencia de puentes remanentes como una de las causas más probables de la formación de núcleos de restitución, tanto en la primera como en la segunda división, y en consecuencia del origen de esporas no reducidas.

Los análisis filogenéticos realizados a partir de secuencias de ADNcp y ADNn son consistentes con los datos cromosómicos ya que muestran a las especies sudamericanas como un grupo monofilético. Si bien en esta tesis no se ha priorizado el estudio de las relaciones interseccionales, el árbol de secuencias de ADNn sugiere que la sección *Notolathyrus* estaría más relacionada con las especies del Mediterráneo que con las especies de la sección *Orobus*. Esta asociación sumada a la mayor similitud morfológica y cromosómica de las especies sudamericanas con las especies de las secciones *Lathyrus*

Clymenum y Lathyrostilis, cuestionan la hipótesis de que las especies sudamericanas se habrían originado a partir de Orobus de Norteamérica.

El análisis realizado constituye el primer aporte tendiente a esclarecer las relaciones filogenéticas existentes dentro de la sección Notolathyrus. Si bien no se obtuvo buena resolución a nivel de especie, en el árbol de ADNcp se formaron dos grandes agrupamientos que son consistentes con las características morfológicas de los frutos. Sin embargo, ninguno de los grupos formados fue congruente con la distribución geográfica. En cuanto a los ciclos de vida, los resultados evidencian que la transición de la perennidad a la anualidad en Notolathyrus habría ocurrido en las etapas tempranas de la diversificación del grupo.

El análisis de la variabilidad de ADNcp en Notolathyrus reveló la existencia de una alta variabilidad haplotípica y nucleotídica, y que la amplia mayoría de los haplotipos están restringidos a las especies y a las muestras poblacionales analizadas. Este hecho sugiere un largo tiempo de divergencia del grupo en Sudamérica. La existencia de haplotipos compartidos entre *L. macropus* con otras especies (*L. crassipes*, *L. magellanicus* var. *tucumanensis* y *L. multiceps*) se explicaría más probablemente por la retención de polimorfismo ancestral en el grupo.

La variabilidad genética observada en las especies de Notolathyrus no estuvo influenciada por el tamaño del área de distribución de las mismas. Por otra parte, la elevada variabilidad haplotípica y nucleotídica observada en los centros de riqueza específica revelan a los mismos como centros de variabilidad genética.

REFERENCIAS

A

- Ab'Sáber AN (1977) Espaços ocupados pela expansão dos climas secos na America do Sul, por ocasião dos períodos glaciais quaternários. *Paleoclimas*, 3: 1-19.
- Ab'Sáber AN (1982) The paleoclimate and paleoecology of Brazilian Amazonia. Biological diversification in the tropics (Prance G ed.), Columbia University Press, New York, pp. 41-59.
- Ali HBM, Meister A, Schubert I (2000) DNA content, rDNA *loci*, and DAPI bands reflect the phylogenetic distance between *Lathyrus* species. *Genome*, 43: 1027-1032.
- Arzani A (2006) Karyotype study in some *Lathyrus* L. accession of Iran. *Iranian Journal Science and Technology*, 30: 9-17.
- Asmussen CB, Liston A (1998) Chloroplast DNA characters, phylogeny, and classifications of *Lathyrus* (Fabaceae). *American Journal of Botany*, 85: 387-401.
- Avice JC (2000) Philogeography. The history & formation of species. Harvard University press. U.K.

B

- Badr A, El Shazly H, El Rabey H, Watson LE (2002) Systematic relationships in *Lathyrus* sect. *Lathyrus* (Fabaceae) based on amplified fragment length polymorphism (AFLP) data. *Canadian Journal of Botany*, 80: 962-969.
- Badr SF (2007) Karyotype analysis and chromosome evolution in species of *Lathyrus* (Fabaceae). *Pakistan Journal of Biological Science*, 10: 49-56.
- Bain JF, Jansen RK (1996) Numerous chloroplast DNA polymorphisms are shared among different populations and species in the aureoid Senecio (*Packera*) complex. *Canadian Journal of Botany*, 74: 1719-1728.
- Barneby RC, Reveal JL (1971) A new species of *Lathyrus* (Fabaceae) from the Death Valley region of California and Nevada. *Aliso*, 7: 361-364.
- Barret SCH (2002) The evolution of plant sexual diversity. *Nature*, 3: 274-284.
- Barret SCH, Kohn JR (1991) Genetic and evolutionary consequences of small population size plants: implications for conservation. In: Falk DA, Holsinger KE, eds. Genetics and Conservation of Rare Plants. Oxford University Press, UK, pp. 3-30.
- Bässler M (1966) Die stellung des sugen. *Orobus* (L.) Baker in der gattung *Lathyrus* L. und seine systematische gliederung. En Kupicha FK (1983) The infrageneric structure of *Lathyrus*. *Notes Royal of Botanical Garden Endirburg*, 41: 209-244.

- Battaglia E** (1955) Chromosome morphology and terminology. *Caryologia*, 8:179-187.
- Battistin A, Fernández A** (1994) Karyotypes of four species of South America natives and one cultivated species of *Lathyrus* L. *Caryologia*, 47:325-330.
- Belaïd Y, Chtourou-Ghorbel N, Marrakchi M, Trifi-Farah N** (2006) Genetic diversity within and between populations of *Lathyrus* genus (Fabaceae) revealed by ISSR Markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 53: 1413-1418.
- Ben Brahim N, Combes D, Marrakchi M** (2001) Autogamy vs. Allogamy in genus *Lathyrus*. *Lathyrus Lathyrism Newsletter*, 2: 21-24.
- Ben Brahim N, Salhi A, Chtourou N, Combes D, Marrakchi M** (2002) Isozymic polymorphism and phylogeny of 10 *Lathyrus* species. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 49: 427-436.
- Bennett MD** (1976) DNA amount, latitude, and crop plant distribution. *Environmental and Experimental Botany*, 16: 93-108.
- Bennett MD** (1987) Variation in genomic form in plants and its economic implications. New Phytologist cytometry. *Plant Molecular Biology*, 9: 229-233.
- Bennett MD, Smith JB** (1991) Nuclear DNA amounts in angiosperms. *Philosophical Transaction of the Royal Society Biological Science*, 334: 309-345.
- Bennett MD, Bhandol P, Leitch IJ** (2000) Nuclear DNA amounts in angiosperms and their modern uses-807 new estimates. *Annals of Botany*, 86: 859-909.
- Bennett MD, Gustafson JP, Smith JB** (1977) Variation in nuclear DNA in the genus *Secale*. *Chromosoma*, 61:149-176.
- Berg C, Greilhuber J** (1992) Cold-sensitive chromosome regions and their relation to constitutive heterochromatin in *Cestrum parqui* (Solanaceae). *Genome*, 35: 921-930.
- Bhattacharjee SK** (1954) Cytogenetics of *Lathyrus sativus* Linn. *Caryologia*, 6: 333-337.
- Boissier E** (1872) *Orobus* and *Lathyrus*. En Kupicha FK (1983) The infrageneric structure of *Lathyrus*. *Notes Royal Botanical Garden Endirburg*, 41: 209-244.
- Bowen CC** (1956) Freezing by liquid carbon dioxide in making slides permanent. *Stain Technology*, 31: 87-90.
- Bretagnolle F, Thompson JD** (1995) Gametes with the somatic chromosome number: mechanisms of their formation and role in the evolution of autopolyploid plants. *New Phytologist*, 129: 1-22.
- Burkart A** (1935) Revisión de las especies de *Lathyrus* de la República Argentina. *Revista de la Facultad de Agronomía y Veterinaria*, 8: 41-128.

Burkart A (1942) Nuevas contribuciones a la sistemática de las especies sudamericanas de *Lathyrus*. *Darwiniana*, 6: 9-29.

Byrne M, Macdonald B, Coates D (2002) Phylogeographical patterns in chloroplast DNA variation within the *Acacia acuminata* (Leguminosae: Mimosoideae) complex in Western Australia. *Journal of Evolutionary Biology*, 15: 576-587.

C

Cannon CH, Manos PS (2003) Phylogeography of the Southeast Asian stone oaks (*Lithocarpus*). *Journal of Biogeography*, 30: 211-226.

Ceccarelli M, Sarri V, Polizzi E, Andreozzi G, Cionini PG (2010) Characterization, evolution and chromosomal distribution of two Satellite DNA sequence families in *Lathyrus* species. *Cytogenetic and Genome Research*, 128: 236-244.

Cerbah M, Coulaud J, Siljak-Yakovlev S (1998) rDNA organization and evolutionary relationships in the *Hypochaeris* (Asteraceae). *Journal of Heredity*, 89: 312-318.

Chowdhury MA, Slinkard AE (2000) Genetics of isozymes in grass pea. *Journal of Heredity*, 91: 142-145.

Chtourou-Ghorbel N, Lauga B, Combes D, Marrakchi M (2001) Comparative genetic diversity studies in the genus *Lathyrus* using RFLP and RAPD markers. *Lathyrus and Lathyrism*. Newsletter, 2: 1-7.

Chtourou-Ghorbel N, Lauga B, Ben Brahim N, Combes D, Marrakchi M (2002) Genetic variation analysis in the genus *Lathyrus* using RAPD markers. *Genetic Resource and Crop Evolution*, 49: 365-372.

Clapperton CM (1993) Nature of environmental changes in South America at the Last Glacial Maximum. *Palaeogeography, Palaeoclimatology Palaeoecology*, 101: 189-208.

Closs en Gay C (1846) Historia física y política de Chile. *Botánica*. En Burkart A (1935) Revisión de las especies de *Lathyrus* de la República Argentina. *Revista de la Facultad de Agronomía y Veterinaria*, 8: 41-128.

Colinvaux PA, de Oliveira PE, Bush MB (2000) Amazonian and neotropical plant communities on glacial time-scale: The failure of the aridity refuge hypotheses. *Quaternary Science Reviews*, 19: 141-169.

Croft AM, Pang ECK, Taylor PWJ (1999) Molecular analysis of *Lathyrus sativus* L. (grasspea) and related species. *Euphytica*, 107: 167-176.

- Cullings KW (1992) Design and testing of a plant-specific PCR primer ecological and evolutionary studies. *Molecular Ecology*, 1: 233-240.
- Cwynar LC, MacDonald GM (1987) Geographical Variation of lodge pole pine in relation to population history. *American Naturalist*, 129: 463-469.
- Czefranova Z (1971) Conspectus systematis generis *Lathyrus* L. *Nov Pl Vasc (Leningrad)* 8: 191-244.

D

- Damuth, E, Fairbridge RW (1970) Equatorial Atlantic deep-sea arkosic sands and Ice-Age aridity in tropical South America. *Bulletin of the Geological Society of America*, 81: 189-206.
- Darlington CD (1965) *Cytology*. JA Churchill, London.
- Davis PH (1970) *Lathyrus*. In Davis PH, ed. *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*, Edimburgh UP, pp. 328-369.
- Defani-Scoarize MA, Pagliarini MS, Aguiar CG (1995) Evaluation of meiotic behavior in double-cross maize hybrids and their parents. *Maydica*, 40: 319-324.
- De la Sota ER (1967) Composición, origen y vinculaciones de la flora pteridológica de las sierras de Buenos Aires (Argentina). *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*, 23: 105-128.
- Dewitte A, Eackhaut T, Van Huylenbroeck J, Van Bockstaele E (2010) Meiotic aberrations during 2n pollen formation in *Begonia*. *Heredity*, 104: 215-223.
- Doležel J, Bartos J (2005) Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. *Annals of Botany*, 95: 99-110.
- Doležel J, Greilhuber RJ, Suda J (2007) Estimation of nuclear DNA content in plant using flow cytometry. *Nature protocols*, 2: 2233-2244.
- Doležel J, Sgorbati S, Lucretti S (1992) Comparison of three DNA fluorochromes for flow cytometric estimation of nuclear DNA content in plants. *Physiologia Plantarum*, 85: 625-631.
- Dorman ER, Bushey AM, Corces VG (2007) The role of insulator elements in large-scale chromatin structure in interphase. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 18: 682-690.
- Doyle JJ, Doyle JL (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemistry Bulletin of the Botanical Society America*, 19: 11-15.
- Doyle JJ, Luckow MA (2003) The rest of the iceberg. Legume diversity and evolution in a phylogenetic context. *Plant Physiology*, 131: 900-910.

Dyer AF (1963) Allocyclic segments of chromosomes and the structural heterozygosity that they reveal. *Chromosoma*, 13: 545-576.

E

Ellstrand NC, Elam DR (1993) Population genetic consequences of small population size: Implications for plant conservation. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematic*, 24: 217-242.

Excoffier L, Smouse PE, Quattro JM (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131: 479-491.

F

Falisticco E (2000) Physical mapping of rRNA genes in *Medicago sativa* and *M. glomerata* by fluorescent in situ hybridization. *Journal of Heredity*, 91: 256-260.

Felsenstein J (1985) Phylogenies and the comparative method. *American Naturalist*, 125, 1-15.

Fennell SR, Powell W, Wright F, Ramsay G, Waugh R (1998) Phylogenetic relationships between *Vicia faba* (Fabaceae) and related species from trnL sequences. *Plant Systematic and Evolution*, 212: 247-259.

Firouzeh J, Wojciechowski MF, Yamanguchi H (2007) Geographical diversification of the genus *Cicer* (Leguminosae: Papilionoideae) inferred from molecular phylogenetic analyses of chloroplast and nuclear DNA sequences. *Botanical Journal of the Linnean society*, 154: 175-186.

Flavell RB (1986) The structure and control of expression of ribosomal RNA genes. Oxford Survey. *Plant Molecular and Cell Biology*, 3: 251-274.

Fowler DP, Morris RW (1977) Genetic diversity in red pine: evidence for low genetic heterozygosity. *Canadian Journal of Forest Research*, 7: 343-347.

Frenguelli J (1950) Rasgos generales de la morfología de la Provincia de Buenos Aires. *Laboratorio de Entrenamiento Multidisciplinario para la Investigación*, pp. 72.

Fuchs J, Kühne M, Schubert I (1998) Assignment of linkage groups to pea chromosomes after karyotyping and gene mapping by fluorescent *in situ* hybridization. *Chromosoma* (Berlin), 107: 272-276.

Furuta Y, Nishikawa K (1991) Variation in nuclear chromosomal DNA content and its role in evolution of plants. In: Gupta PK Tsuchiya T. Chromosome engineering in plants. Part A. Elsevier Science Publishers BV, Amsterdam, the Netherlands, pp. 71-85.

G

- Galasso I, Schmidt T, Pignone D (2001) Identification of *Lens culinaris* ssp. *Culinaris* chromosomes by physical mapping of repetitive DNA sequences. *Chromosome Research*, 9: 199-209.
- Galasso I, Schmidt T, Pignone D, Heslop-Harrison JS (1996) The molecular cytogenetics of *Vigna unguiculata* (L): the physical organization and characterization of 18S-25S rDNA, 5S rDNA, telomere-like sequences and a family of centromeric repetitive DNA sequences. *Theoretical and Applied Genetics*, 91: 928-935.
- Gentry HS (1982) *Agaves of Continental North America*. University of Arizona Press, Tucson, Arizona.
- Gernandt DS, Liston A, Piñero D (2003) Phylogenetics of *Pinus* Subsections Cembroides and Nelsoniae Inferred from cpDNA Sequences. *Systematic Botany*, 28: 657-673.
- Gernandt DS, Geada-López G, Ortiz-García S, Liston A (2005) Phylogeny and classification of *Pinus*. *Taxon*, 54: 29-42.
- Gibson N, Barker PCJ, Cullen PJ, Shapcott A (1995) Conifers of southern Australia. In Enright NJ, Hill RS, eds. *Ecology of the Southern Conifers*. Melbourne University Press, Australia, pp. 223-251.
- Godron DA (1848) *Lathyrus*. In Grenier JCM, Godron CM eds. *Flore de France*. Paris y Besaçon, pp. 478-492.
- Goldblatt P (1981) Cytology and Phylogeny of Leguminosae. In: Polhill RM, Raven PH, eds. *Advances in Legume Systematics*. Part II. Royal Botanic Kew. England.
- Golden JL, Bain JF (2000) Phylogeographic patterns and high levels of chloroplast DNA diversity in four *Packera* (Asteraceae) species in southwestern. *Evolution*, 54: 1566-1579.
- Golenberg EM, Clegg MT, Durbin ML, Doebley J, Ma DP (1993) Evolution of a non-coding region of the chloroplast genome. *Molecular and Phylogenetic Evolution*, 2: 52-64.
- Grant V (1981) *Plant speciation*. New York: Columbia University Press.
- Greilhuber RJ, Speta F (1976) C-banded karyotypes in the *Scilla hohenackeri* group, *S. persica* and *Puschkinia* (Liliaceae). *Plant Systematic and Evolution*, 126: 149-188.
- Grela IA (2004) *Geografía florística de las especies arbóreas de Uruguay: propuesta para la delimitación de dendrofloras*. Tesis de Maestría, Programa de Desarrollo de las

Ciencias Básicas, Ministerio de Educación y Cultura, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

- Guerra M (2000) Patterns of heterochromatin distribution in plant chromosomes. *Genetic Molecular Biology*, 23: 1029-1041.
- Gunn CR, Kluge J (1976) Androecium and pistil characters for tribe Viciae (Fabaceae). *Taxon*, 25: 563-575.
- Gutiérrez JF, Vaquero F, Vences FJ (1994) Allopolyploid vs. Autopolyploid origins in the genus *Lathyrus* (Leguminosae). *Heredity*, 73: 29-40.
- Gutiérrez LB, Fuertes Aguilar J, Feliner N (2002) Glacial-induced altitudinal migrations in *Armeria* (Plumbaginaceae) inferred from patterns of chloroplast DNA haplotype sharing. *Molecular Ecology*, 11: 1965-1974.
- Guzmán NV (2010) Filogeografía comparada de dos especies de gorgojos plaga con distintos modos de reproducción. Tesis Doctoral, Universidad de Buenos Aires, Argentina.

H

- Haffer J (1982) General aspects of the refuge theory. In: Prance GT, ed. Biological diversification in the Tropics. Part 1: The refuge theory. Columbia University, New York, NY, pp. 6-24.
- Hall KJ, Parker JS, Ellis THN (1997) The relationship between genetic and cytogenetic maps of pea. I. Standard and translocation karyotypes. *Genome*, 40: 744-754.
- Hamilton MB (1999) Four primer pairs for the amplification of chloroplast intergenic regions with intraspecific variation. *Molecular Ecology*, 8: 521-523.
- Hammett KRW, Murray BG, Kennen R, Markham Hallett IC (1994) Interspecific hybridization between *Lathyrus odoratus* and *L. belinensis*. *International Journal of Plant Science*, 155: 763-771.
- Hamrick JL, Godt MJW (1989) Allozyme diversity in plant species. In: Brown ADH, Clegg MT, Kahler AL, Weir BS, eds. Plant population genetics and genetic resources. Sinauer, Sunderland, pp. 43-63.
- Hamrick JL, Godt MJW, Sherman-Broyles SL (1992) Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species. *New Forests*, 6: 95-124.
- Harlan JR, de Wet MJM (1975) On *Ö* Winge and a prayer: the origins of polyploidy. *Botanical Review*, 41: 361-390.

Hizume M, Shibata F, Matsusaki Y, Garajova Z (2000) Chromosome identification and comparative karyotypic analyses of four *Pinus* species. *Theoretical and Applied Genetics*, 105: 491-497.

Hooker WJ, Arnott AW (1831) The botany of captain beechey's Voyage pp. 20. En **Burkart A (1935)** Revisión de las especies de *Lathyrus* de la República Argentina. *Revista de la Facultad de Agronomía y Veterinaria*, 8: 41-128.

Hossaert M, Bashar A, Mackey D (1986) Floral nectar production in relation to insect activity in *Lathyrus latifolius*. In **Kaul AK, Combes D, eds.** *Lathyrus* and lathyrism. Third Medical Research Foundation: New York, pp. 213-221.

I

InfoStat (2009) InfoStat version 2009. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

Iriondo MH (1999) Climatic changes in the South American plains: records of a continent-scale oscillation. *Quaternary International*, 57-58: 93-112.

Iriondo MH, García NO (1993) Climatic variations in the Argentine plains during the last 18,000 years. *Palaeogeography, palaeoclimatology, Palaeoecology*, 101: 209-220.

Izaguirre P, Byhaut R (1997) Las Leguminosas de Uruguay y regiones vecinas. ed. HS. Flora Uruguay. Parte I. Papilionoideae.

J

Jukes TH, Cantor CR (1969) Evolution of protein molecules. In: **Munro HN, ed.** *Mammalian Protein Metabolism*. Academic Press, New York, pp. 21-132.

K

Kelchner SA (2000) The evolution of non-coding chloroplast DNA and its application in plant systematics. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 87: 499-527.

Kelchner SA, Clark LG (1997) Molecular evolution and phylogenetic utility of the chloroplast rpl16 intron in *Chusquea* and the Bambusoideae (Poaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 8: 385-397.

Kenicer G (2008) An introduction to the genus *Lathyrus* L. *Curti's Botanical Garden*, 25: 286-295.

Kenicer GJ, Kajita T, Pennington RT, Murata J (2005) Systematics and biogeography of *Lathyrus* (Leguminosae) based on internal transcribed spacer and cpDNA sequence data. *American Journal of Botany*, 92: 1199-1209.

Khawaja HIT, Sybenga J, Ellis JR (1998) Meiosis in aneuploids of tetraploid *Lathyrus odoratus* and *L. pratensis*. *Hereditas*, 129: 53-57.

- King M (1993) Species evolution, the role of chromosome change. Cambridge University Press.
- Kislev ME (1989) Origins of the cultivation of *Lathyrus sativus* and *L. cicera* (Fabaceae). *Society for Economic Botany*, 43: 262-270.
- Klamt A, Schifino-Wittmann MT (2000) Karyotype morphology and evolution in some *Lathyrus* (Fabaceae) species of southern Brazil. *Genetic and Molecular Biology*, 23: 463-467.
- Kovalsky IE, Solís Neffa V (2012) Evidence of 2n microspore production in a natural diploid population of *Turnera sidoides* subsp. *carnea* and its relevance in the evolution of the *T. sidoides* (Turneraceae) autopolyploid complex. *Journal of Plant Research*, 125: 725-734.
- Kozak M, Bocianowski J, Rybinski W (2008) Selection of promising genotypes based on path and cluster analyses. *Journal of Agricultural Science*, 146: 85-92.
- Krapovickas A, Fuchs AM (1957) Notas citológicas sobre Leguminosas. II. *Revista Investigaciones Agrícolas*, 11: 215-218.
- Kumar A, Bennetzen JL (1999) Plant retrotransposon. *Annual Review of Genetics*, 33: 479-532.
- Kupicha FK (1975) Observations of the vascular anatomy of the tribe Viciae (Leguminosae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 70: 231-242.
- Kupicha FK (1981) Viciae (Adans.) DC. (1825) nom conserve prop. In: Polhill RM, Raven PH, eds. *Advances in Legume Systematics 1*. Kew: *Royal of the Botanical Garden*, pp. 377-381.
- Kupicha, FK (1983) The infrageneric structure of *Lathyrus*. *Notes of the Royal Botanical Garden Edinburg*, 41: 209-244.
- Kuser JE, Meagher TR, Sheely DL, White A (1997) Allozyme frequencies in New Jersey and North Carolina populations of Atlantic white-cedar, *Chamaecyparis thyoides* (Cupressaceae). *American Journal of Botany*, 84: 1536-1541.

L

- Lammark JB (1786-88) Encyclopédie méthodique. Botanique 2:703-711. En Burkart A (1935) Revisión de las especies de *Lathyrus* de la República Argentina. *Revista de la Facultad de Agronomía y Veterinaria*, 8: 41-128.
- Lavana UC, Sharma AK (1980) Giemsa C banding in *Lathyrus* L. *Botanical Gazette*. 141: 199-203.

- Lavia GI, Ortíz MA, Robledo G, Fernández A, Seijo G (2011) Origin of triploid *Arachis pintoii* Krapov., W.C. Gregory (Leguminosae) by autopolyploidy evidenced by FISH and meiotic behaviour. *Annals of Botany*, 108: 103-111.
- Lavin M, Luckow M (1993) Origins and relationships of tropical North America in the context of the boreotropics hypothesis. *American Journal of Botany*, 80: 1-14.
- Levin M, Herendeen PS, Wojciechowski M (2005) Evolutionary rates analysis of Leguminosae implicates a rapid diversification of lineages during the tertiary. *Systematic Biology*, 54: 575-594.
- Levan A, Fredga K, Sandberg AA (1964) Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas*, 52: 201-220.
- Lim KB, Ramanna MS, Dejong JH, Jacobsen E, Van Tuyl JM (2001) Indeterminate Meiotic Restitution (IMR): a novel type of meiotic nuclear restitution mechanism detected in interspecific lily hybrids by GISH. *Theoretical Applied and Genetic*, 103: 219-230.
- Loidl J (1983) Some features of heterochromatin in wild *Allium* species. *Plant Systematic and Evolution*, 143:117-131.
- Love RM (1949) Estudios citológicos preliminares de trigos Rio- Grandenses. Porto Alegre: Secretaria da Agricultura.

M

- Markgraf V, Bradbury JP (1982) Holocene climatic history of South America. *Striae*, 16: 40-45.
- Martcorena C, Quesada M (1985). Catálogo de la flora vascular de Chile. *Gayana Botánica*, 42: 5-157.
- Mathiasen P, Premoli AC (2010) Out in the cold: genetic variation of *Nothofagus pumilio* (Nothofagaceae) provides evidence for latitudinally distinct evolutionary histories in austral South America. *Molecular Ecology*, 19: 371-385.
- Matthew AG, Soltis P (1999) Patterns of genetic variation in rare and widespread plant congeners. *American Journal of Botany*, 87: 783-792.
- McKinnon GE, Jordan GJ, Vaillancourt RE, Steane DA, Potts BM (2004) Glacial refugia and reticulate evolution: the case of the Tasmanian eucalyptus. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B*, 359: 275-284.
- McKinnon GE, Vaillancourt RE, Jackson HD, Potts BM (2001) Chloroplast sharing in the Tasmanian eucalyptus. *Evolution*, 55:703-711.

- McLachlan JS, Clark JS, Manos PS (2005) Molecular indicators of tree migration capacity under rapid climate change. *Ecology*, 86: 2088-2098.
- Melderis A, Viksne A (1931) Notes on the genus *Lathyrus*. *Acti Horti Botanici Universitatis Latviensis*, S: 90-94.
- Montúfar R, Pintaud JC (2008) Taxonomic status of *Oenocarpus bataua* (Euterpeae, Arecaceae) inferred from plastid sequences. *Revista Peruana de Biología*, 15: 73-78.
- Morley RJ (2000) Origin and evolution of tropical rain forests. Wiley & Sons, New York.
- Morley RJ (2003) Interplate dispersal paths for megathermal angiosperms. *Plant Ecology Evolution and Systematic*, 6: 5-20.
- Morley RJ, Dick CW (2003) Missing fossils, molecular clocks, and the origin of the Melastomataceae. *American Journal of Botany*, 90: 1638-1644.
- Moscone EA, Klein F, Lambrou M, Fuchs J, Schweizer D (1999) Quantitative karyotyping and dual-color FISH mapping of 5S and 18S-25S rDNA probes in the cultivated *Phaseolus* species (*Leguminosae*). *Genome*, 42: 1224-1233.
- Moscone EA, Matzke MA, Matzke AJM (1996) The use of combined FISH/GISH in conjunction with DAPI counterstaining to identify chromosomes containing transgene inserts in amphidiploid tobacco. *Chromosoma*, 105: 231-236.
- Moscone EA, Scaldaferrero MA, Grabile M, Cecchini NM, García YS, Jarret R, Daviña JR, Ducasse DA, Barboza GE and Ehrendorfer F (2007) The evolution of chili peppers (*Capsicum* – *Solanaceae*): a cytogenetic perspective. *Acta Horticulturae*, 745: 137-169.
- Murray BG, Hammett KRW, Standring LS (1992) Genomic constancy during the development of *Lathyrus odoratus* cultivars. *Heredity*, 68: 1-32.

N

- Nagl W, Ehrendorfer F (1974) DNA content, heterochromatin, mitotic index, and growth in perennial and annual *Anthemideae* (*Asteraceae*). *Plant Systematic and Evolution*, 123: 35-54.
- Nandini AV, Hammett KRW, Murray BG (1999) Interspecific hybridization in perennial species of *Lathyrus* (*Fabaceae*). *Agronomie*, 19: 521-529.
- Naranjo C, Poggio L (2004) Citogenética. En: biotecnología y mejoramiento vegetal. Parte II, Cáp. 5. INTA. Buenos Aires, Argentina, pp. 70-79.
- Narayan, RKJ (1982) Discontinuous DNA variation in the evolution of plant species: the genus *Lathyrus*. *Evolution*, 36: 877-891.

- Narayan RKJ (1986) DNA changes in chromosome differentiation and evolution in *Lathyrus*. In "Lathyrus and Lathyrism". In: Kaul AK, Combes D, eds. Third World Medical Research Foundation, New York, pp. 67-79.
- Narayan RKJ, Durrant A (1983) DNA distribution in chromosomes of *Lathyrus*. *Genetica*, 61: 47-54.
- Narayan RKJ, McIntyre FK (1989) Chromosomal DNA variation, genomic constraints and recombination in *Lathyrus*. *Genetica*, 79: 45-52.
- Narayan RKJ, Rees H (1977) Nuclear DNA divergence among *Lathyrus* species. *Chromosoma*, 63: 101-107.
- Neubert EE, Miotto STS (2001) O gênero *Lathyrus* L. (Leguminosae- Faboideae) no Brasil. *Iheringia, Série Botânica*, 56: 51-114.
- Novaes RML, Rodrigues JG, Lovato MB (2010) Phylogeography of *Plathymentia reticulata* (Leguminosae) reveals patterns of recent range expansion towards northeastern Brazil and southern Cerrados in Eastern Tropical South America. *Molecular Ecology*, 19: 985-998.

P

- Page RDM (1996) TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences*, 12: 357-358.
- Palmer HC, Smelds CR, Cohen DB, Orton TJ (1983) Chloroplast DNA evolution and the origin of amphidiploid *Brassica*. *Theoretical and Applied Genetics*, 65: 181-189.
- Parker G, Marcolini S, Cavallotto JL, Violante RA (1997) Modelo esquemático de dispersión de sedimentos en el Río de la Plata. *Revista Ciencia y Tecnología del Agua*, 1: 68-80.
- Pennington RT, Prado DE, Pendry CA (2000) Neotropical seasonally dry forests and Quaternary vegetation changes. *Journal of Biogeography*, 27: 261-273.
- Pittenger TH, Frolik EF (1951) Temporary mounts for pollen abortion determinations. *Stain Technology*, 26: 181-184.
- Poggio L, Espert SM, Fortunato RH (2008) Citogenética evolutiva en Leguminosas americanas. *Rodriguésia* 59: 423-433.
- Poggio L, Rosato M, Chiavarino AM, Naranjo C (1998) Genome size and environmental correlations in Maize (*Zea mays* ssp. *mays*, Poaceae). *Annals of Botany*, 82: 107-115.

Q

Quiroga MP (2009) Contribución para la conservación de Podocarpaceae del Sur de Sudamérica a partir de patrones genéticos y biogeográficos. Tesis Doctoral, Universidad Nacional del Comahue, Argentina.

Quiroga MP, Premoli AC (2007) Genetic patterns in *Podocarpus parlatorei* reveal the long-term persistence of cold-tolerant elements in the southern Yungas. *Journal of Biogeography*, 34: 447-455.

R

Raina SN, Mukai Y, Kawaguchi K, Goel S, Jain A (2001) Physical mapping of 8S–5.8S–26S and 5S ribosomal RNA gene families in three important vetches (*Vicia* species) and their allied taxa constituting three species complexes. *Theoretical and Applied Genetics*, 103: 839-845.

Raven PH, Axelrod DI (1974) Angiosperm biogeography and past continental movements. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 61: 539-673.

Rees H, Hazarika MH (1969) Chromosome evolution in *Lathyrus*. *Chromosomes Today*, 2: 158-165.

Rees H, Narayan RKJ (1977) Evolutionary DNA variation in *Lathyrus*. *Chromosomes Today*, 6: 131-139.

Reeves A (2001) MicroMeasure: a new computer program for the collection and analysis of cytogenetic data. *Genome*, 44: 239-443.

Rieseberg LH, Soltis DE (1991) Phylogenetic consequences of cytoplasmic gene flow in plants. *Evolutionary Trends in Plants*, 5: 65-84.

Rieseberg LH, Wendel JF (1993) Introgression and its consequences in plants. In: Harrison RG, ed. *Hybrid Zones and the Evolutionary Process* Oxford University Press, Oxford, pp. 70-109.

Rieseberg LH, Whitton J, Linder CR (1996) Molecular marker incongruence in plant hybrid zones and phylogenetic trees. *Acta Botanica of the Netherlands*, 45: 243-262.

Risso-Pascotto C, Pagliarini MS, Valle CB (2006) A new basic chromosome number for the genus *Brachiaria* (Trin.) Griseb (Poaceae: Panicoideae: Paniceae). *Genetic Resource and Crop Evolution*, 53: 7-10.

Robledo G, Seijo JG (2008) Characterization of the *Arachis* (Leguminosae) D genome using fluorescence *in situ* hybridization (FISH) chromosome markers and total genome DNA hybridization. *Genetics and Molecular Biology*, 31: 717-724.

- Robledo G, Seijo JG (2010).** Species relationships among the wild B genome of *Arachis* species (section *Arachis*) based on FISH mapping of rDNA loci and heterochromatin detection: A new proposal for genome arrangement. *Theoretical and Applied Genetics*, 121: 1033-1046.
- Robledo G, Lavia GI, Seijo JG (2009).** Species relations among wild *Arachis* species with the A genome as revealed by FISH mapping of rDNA loci and heterochromatin detection. *Theoretical and Applied Genetics*, 118: 1295-1307.
- Romero-Zarco C (1986)** A new method for estimating karyotype asymmetry. *Taxon* 35: 526-530.
- Rosa MJS, Ferreira FB, Teixeira AR (2000)** Storage proteins from *Lathyrus sativus* seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48: 4432-5439.
- Rossow RA (1982)** Notas sobre el género *Lathyrus*. *Darwiniana*, 24: 489-495.
- Rozas J, Sánchez-Del Barrio C, Messeguer X, Rozas R (2003)** DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics*, 19: 2496-2497.

S

- Schaal BA, Hayworth DA, Olsen KM, Rauscher JT, Smith WA (1998)** Phylogeographic studies in plants: problems and prospects. *Molecular Ecology*, 7: 465-474.
- Schaal BA, Olsen KM (2000)** Gene genealogies and population variation in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 97, 7024-7029.
- Schneider S, Roessli D, Excoffier L (2000)** ARLEQUIN V. 2.000: A software for population genetics data analysis. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland.
- Schubert I, Wobus U (1985).** In situ hybridization confirms jumping nucleolus organizing regions in *Allium*. *Chromosoma*, 92: 143-148.
- Schwarzacher T, Heslop-Harrison P (2000)** Practical in situ hybridization. BIOS Scientific, New York.
- Schweizer D (1980)** Simultaneous fluorescent staining of R bands and specific heterochromatic regions (DA/DAPI bands) in human chromosomes. *Cytogenetics and Cell Genetic*, 27: 190-193.
- Schweizer D, Loidl J (1987)** A model for heterochromatin dispersion and the evolution of C-band patterns. *Chromosomes Today*, 9: 61-74.

- Seijo JG (2002) Estudios citogenéticos en especies Sudamericanas del género *Lathyrus*, Sección Notolathyrus (Leguminosae). Tesis Doctoral, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina.
- Seijo JG, Fernández A (2003) Karyotype analysis and chromosome evolution in South American species of *Lathyrus* (Leguminosae). *American Journal of Botany*, 90: 980-987
- Seijo JG, Lavia GI, Fernández A, Krapovickas A, Ducasse D, Moscone EA (2004). Physical mapping of 5S and 18S-25S rRNA genes evidences that *Arachis duranensis* and *A. ipaensis* are the wild diploid species involved in the origin of *A. hypogaea* (Leguminosae). *American Journal of Botany*, 91: 1294-1303.
- Seijo JG, Solís Neffa VG (2006) Cytogenetic studies in the rare South American *Lathyrus hasslerianus* Burk. *Cytologia*, 71: 11-19.
- Senn HA (1938) Experimental data for a revision of the genus *Lathyrus*. *American Journal of Botany*, 25: 67-78.
- Shapcott A (1991) Dispersal and establishment of Huon pine (*Lagarostrobus franklinii*). *Papers and Proceedings of the Royal Society of Tasmania*, 125: 17-26.
- Sharma AK, Datta PC (1959) Application of improved technique in tracing karyotype difference between strains of *Lathyrus odoratus* L. *Cytologia*, 24: 389-402
- Sherman-Broyles SL, Gibson JP, Hamrick JL, Bucher MA, Gibson MJ (1992). Comparison of allozyme diversity among rare and widespread *Rhus* species. *Systematic Botany*, 17: 551- 559.
- Simola LK (1968) Comparative studies on number of leaflets, venation, and epidermal structure in the genus *Lathyrus*. *Canadian Journal of Botany*, 46: 71-84.
- Simonet M (1932) Numerations chromosomiques dans les genres *Baptisia*, *Thermopsis* et *Lathyrus*. *Comptes Rendus Académie de Sciences*, 195-739.
- Simpson BB (1983) An historical phytogeography of the high Andean flora. *Revista Chilena de Historia Natural*, 56: 109-122.
- Simmons MP, Ochotorena H (2000) Gaps as characters in sequence-based phylogenetic analyses. *Systematic Biology*, 49: 369-381.
- Slotkin RK, Martienssen R (2007) Transposable elements and the epigenetic regulation of the genome. *Nature Reviews Genetic*, 8: 272-285.
- Smýkal P, Kenicer G, Flavell AJ, Corander J, Kosterin O, Redden RJ, Ford R, Coyne CJ, Maxted N, Ambrose MJ, Ellis NTH (2010) Phylogeny, phylogeography and genetic diversity of the *Pisum* genus. *Plant Genetic Resources*, 9: 4-18.

- Soltis DE, Kuzoff RK (1995) Discordance between nuclear and chloroplast phylogenies in the *Heuchera* group (Saxifragaceae). *Evolution*, 49: 727-742.
- Soltis DE, Soltis PS (1999) Polyploidy: recurrent formation and genome evolution. *Trends in Ecology and Evolution*, 14: 348-352.
- Speranza PR, Seijo JG, Grela IA, Solís Neffa VG (2007) Chloroplast DNA variation in the *Turnera sidoides* L. complex (Turneraceae). *Journal of Biogeography*, 34: 427-436.
- Staginnus C, Winter P, Desel C, Schmidt T, Kahl G (1999) Molecular structure and chromosomal localisation of major DNA families in the chickpea (*Cicer arietinum*) genome. *Plant Molecular Biology*, 39: 1037-1050.
- Stebbins GL (1971) Chromosomal evolution in higher plants. Edward Arnold, London, UK.
- Steele KP, Wojciechowski MF (2003) Phylogenetic analyses of tribes Trifolieae and Vicieae, based on sequences of the plastid gene *matK* (Papilionoideae: Leguminosae). In: Klitgaard BB, Bruneau E, eds *Advances in Legume Systematics*. Kew: Royal Botanical Garden, pp. 355-370.
- Swofford DL (2002) PAUP. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (and Other Methods). Version 4. Sinauer and Associates, Sunderland, Massachusetts.

T

- Taberlet P, Gielly L, Pautou G, Bouvet J (1991) Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology*, 17: 1105-1109.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2007) MEGA 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 24: 1596-1599.
- Tayyar RI, Lukaszewski AJ, Waines JG (1994) Chromosome banding patterns in the annuals species of *Cicer*. *Genome*, 37: 656-663.
- Templeton AR (1998) Nested clade analysis of phylogeographic data: testing hypotheses about gene flow and population history. *Molecular Ecology*, 7: 381-397.
- Thomas HM, Harper JA, Meredith MR, Morgan WG, King IP (1997) Physical mapping of ribosomal DNA sites in *Festuca arundinacea* and related species by *in situ* hybridization. *Genome*, 40: 406-410.

U

Ünal F, Wallace AJ, Callow RS (1995) Diverse heterochromatin in *Lathyrus*. *Caryologia*, 48: 47-63.

V

Van der Hammen T, Hooghiemstra H (2001) Historia y paleoecología de los bosques montanos andinos neotropicales. In: Kappelle M, Brown AD, eds. Bosques nublados del neotrópico. Instituto Nacional de Biodiversidad, Costa Rica, pp. 63-84.

Vanni RO (2005) *Lathyrus linearifolius* (Leguminosae-Vicieae), especie confirmada para la flora argentina. *Bonplandia*, 14: 97-100.

Vaz-Patto MC, Rubiales D (2009) Identification and characterization of partial resistance to rust in a germplasm, collection of *Lathyrus sativus* L. *Plant Inbreeding*, 128: 495-500.

Vaz Patto MC, Skiba B, Pang ECK, Ochatt SJ, Lambein F, Rubiales D (2006) *Lathyrus* improvement for resistance against biotic and abiotic stresses: From classical breeding to marker assisted selection. *Euphytica*, 147: 133-147.

Venora G, Galasso I, Pignone D (1995) Quantitative heterochromatin determination by means of image analysis. *Journal of Genetic and Breeding*, 49: 187-190.

Verma SC (1978) Proximal localization of constitutive heterochromatin in the legume *Lathyrus tingitanus*. *Nucleus*, 21: 125-131.

Verma SC, Ohri D (1979) Chromosome and nuclear phenotype in the legume *Lathyrus sativus* L. *Cytologia*, 44: 77-90.

Villagrán C (2001) Un modelo de la historia de la vegetación de la Cordillera de la costa de Chile central-sur: la hipótesis glacial de Darwin. *Revista Chilena de Historia Natural*, 74: 793-803.

Vogel J (1839) *Linnaea*, 13: 22-31. En Burkart A (1935) Revisión de las especies de *Lathyrus* de la República Argentina. *Revista de la Facultad de Agronomía y Veterinaria*, 8: 41-128.

Vorsa N, Bingham ET (1979) Cytology of 2n pollen formation in diploid alfalfa, *Medicago sativa*. *Canadian Journal of Genetic and Cytology*, 21: 525-530.

Vuilleumier B (1971) Pleistocene changes in the fauna and flora of South America. *Science*, 173: 529-554.

W

- White MJD (1978) Modes of speciation. Freeman WH and Company. San Francisco, USA.
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, eds. PCR Protocols: a guide to methods and applications. Academic Press, New York, USA, pp. 315-322.
- Widmer A, Baltisberger M (1999) Extensive intraspecific chloroplast DNA (cpDNA) variation in the alpine *Draba aizoides* L. (Brassicaceae): haplotype relationships and population structure. *Molecular Ecology*, 8: 1405-1415.
- Winge O (1919) On the relation between number of chromosomes and number of types in *Lathyrus* especially. *Journal of Genetics*, 8: 133-138.
- Wonly E, Hasterok R (2009) Comparative cytogenetic analysis of the genomes of the model grass *Brachypodium distachyon* and its close relatives. *Annals of Botany*, 104: 873-881.

Y

- Yamamoto K, Fujiwara T, Blumenreich D (1984) Karyotypes and morphological characteristics of some species in the genus *Lathyrus* L. *Japanese Journal of Breeding*, 34: 273-284.
- Yunus AG, Jackson MT, Catty JP (1991) Phenotypic polymorphisms of six enzymes in the grasspea (*Lathyrus sativus* L.). *Euphytica*, 55: 33-42.

Z

- Zabinski C (1992) Isozyme variation in eastern hemlock. *Canadian Journal of Forest Research*, 22: 1838-1842.
- Zawko G, Krauss L, Dixon KW, Sivasithamparam K (2001) Conservation genetics of the rare endangered *Leucopogon obtectus* (Ericaceae). *Molecular Ecology*, 10: 2389-2396.

ANEXO


```

88      : ..... : 800
93      : ..... : 800
97      : ..... : 800
105     : ..... : 800
L.filiiformis : ..... : 800
L.japonicus   : ..... : 800
L.jepsonii    : ..... : 800
L.odoratus    : ..... : 800
L.pallescens  : ..... : 800
L.spathulatus : ..... : 800
L.sylvestris  : ..... : 800
L.tingitanus  : ..... : 800
L.vernus      : ..... : 800
Vicia cracca  : ..... : 800
cATTAGGGGGcCCTTTACGACGAACatGTaAAcACTCATTATCAaAAATtCTtTGcACCTATTTcAtAATtAtGActGATTCCCTTGtTcGACAAAAGA

```

```

*
1       : ..... : 819
2       : ..... : 819
12      : ..... : 819
14      : ..... : 819
23      : ..... : 819
28      : ..... : 819
29      : ..... : 819
38      : ..... : 819
39      : ..... : 819
44      : ..... : 819
49      : ..... : 819
58      : ..... : 819
59      : ..... : 819
68      : ..... : 819
81      : ..... : 819
88      : ..... : 819
93      : ..... : 819
97      : ..... : 819
105     : ..... : 819
L.filiiformis : ..... : 819
L.japonicus   : ..... : 819
L.jepsonii    : ..... : 819
L.odoratus    : ..... : 819
L.pallescens  : ..... : 819
L.spathulatus : ..... : 819
L.sylvestris  : ..... : 819
L.tingitanus  : ..... : 819
L.vernus      : ..... : 819
Vicia cracca  : ..... : 819
TCtTTTtATATACAAtAat

```

En la base superior se indican la posición de los nucleótidos. Los puntos corresponden a idénticos residuos en toda la secuencia. Con fondo gris se marcan los sitios polimórficos y dentro de ellos las letras indican el sentido del cambio. Los números corresponden a los códigos de la Tabla 1.

Matriz 2. Matriz alineada de la región nuclear ITS1-ITS2 para los análisis filogenéticos realizados en el Capítulo IV.

1	:*20*40*60*80*100	:	100
2	:	:	100
12	:CT	:	100
59	:	:	100
97	:	:	100
60	:A	:	100
49	:	:	100
81	:	:	100
29	:	:	100
44	:	:	100
93	:	:	100
38	:	:	100
27	:	:	100
39	:GGTT	100
61	:CT	100
14	:A	100
88	:	100
<i>L.pallescens</i>	:	100
<i>L.filiiformis</i>	:	100
<i>L.spathulatus</i>	:	100
<i>L.jepsonii</i>	:	100
<i>L.vernus</i>	:	100
<i>L.alpestris</i>	:	100
<i>L.japonicus</i>	:	100
<i>L.tingitanus</i>	:	100
<i>L.odoratus</i>	:	100
<i>L.sylvestris</i>	:	100
<i>Vicia craca</i>	:	100

CGATGCCTTACATGCAGTCCAAACacGtGAATtaGtTGGAA ACAta GGTGggCttGAGGTGttcCaCACCCccGg tgCCacTGGTTtcggAGGcGgAC

1	:*120*140*160*180*200	:	200
2	:	:	200
12	:	:	200
59	:	:	200
97	:	:	200
60	:	:	200
49	:	:	200
81	:	:	200
29	:	:	200
44	:	:	200
93	:	:	200
38	:	:	200
27	:	:	200
39	:	:	200
61	:	:	200
14	:	:	200
88	:	:	200
<i>L.pallescens</i>	:	:	200
<i>L.filiiformis</i>	:	:	200
<i>L.spathulatus</i>	:	:	200
<i>L.jepsonii</i>	:	:	200
<i>L.vernus</i>	:	:	200
<i>L.alpestris</i>	:	:	200
<i>L.japonicus</i>	:	:	200
<i>L.tingitanus</i>	:	:	200
<i>L.odoratus</i>	:	:	200
<i>L.sylvestris</i>	:	:	200
<i>Vicia craca</i>	:	:	200

GaCgaaGTgCGTTCTCcT tgtgCC AACTCAAACccccG CGctgAATGCGTCAAGGaATTttAacTTTGCTctGAgCGcAtCcGCATGGcAcCGGaga

1	:*220*240*260*280*300	:	300
2	:	:	300
12	:	:	300
59	:	:	300
97	:	:	300
60	:	:	300
49	:	:	300
81	:	:	300
29	:	:	300
44	:	:	300
93	:	:	300
38	:	:	300
27	:	:	300
39	:	:	300
61	:	:	300
14	:	:	300
88	:	:	300
<i>L.pallescens</i>	:	:	300
<i>L.filiiformis</i>	:	:	300
<i>L.spathulatus</i>	:	:	300
<i>L.jepsonii</i>	:	:	300

L. vernus : : 300
L. alpestris : : 300
L. japonicus : : 300
L. tingitanus : : 300
L. odoratus : : 300
L. sylvestris : : 300
Vicia craca : : 300

CCGTTTcCGTgCGGgttGtGTTTTGACACAttATATAGAATGACTCTCGGCAACGGATATCTAGGCTCTTGCATCGATGAAGaaCGTAGCGAAATGCGAT
 * 320 * 340 * 360 * 380 * 400

1 : : 400
 2 : : 400
 12 : : 400
 59 : : 400
 97 : : 400
 60 : : 400
 49 : : 400
 81 : : 400
 29 : : 400
 44 : : 400
 93 : : 400
 38 : : 400
 27 : : 400
 39 : : 400
 61 : : 400
 14 : : 400
 88 : : 400
L. pallescens : : 400
L. filiformis : : 400
L. spathulatus : : 400
L. jepsonii : : 400
L. vernus : : 400
L. alpestris : : 400
L. japonicus : : 400
L. tingitanus : : 400
L. odoratus : : 400
L. sylvestris : : 400
Vicia craca : : 400

ACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCCTGAACCATCGAgTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGATGCCATTAGGTTGAGGGCACGTCTGCCTGgGtGTCACAT

1 : : 500
 2 : : 500
 12 : : 500
 59 : : 500
 97 : : 500
 60 : : 500
 49 : : 500
 81 : : 500
 29 : : 500
 44 : : 500
 93 : : 500
 38 : : 500
 27 : : 500
 39 : : 500
 61 : : 500
 14 : : 500
 88 : : 500
L. pallescens : : 500
L. filiformis : : 500
L. spathulatus : : 500
L. jepsonii : : 500
L. vernus : : 500
L. alpestris : : 500
L. japonicus : : 500
L. tingitanus : : 500
L. odoratus : : 500
L. sylvestris : : 500
Vicia craca : : 500

ATCGAAGCCTCcTgCcaATAgT CTTTTgacag TaTtGtGcaG GtGgATGTTGGCCTCCcGTGAGCTctTtctgTCTCaTGGTTGGTTGAAAAtGAG

1 : : 600
 2 : : 600
 12 : : 600
 59 : : 600
 97 : : 600
 60 : : 600
 49 : : 600
 81 : : 600
 29 : : 600
 44 : : 600
 93 : : 600
 38 : : 600
 27 : : 600
 39 : : 600
 61 : : 600
 14 : : 600

```

88      : .....T..... : 600
L.pallescens : .....T..... : 600
L.filiiformis : .....T..... : 600
L.spathulatus : .....TT..... : 600
L.jepsonii : .....A.T..... : 600
L.vernus : .....T..... : 600
L.alpestris : .....G..... : 600
L.japonicus : .....G..... : 600
L.tingitanus : .....A.T..... : 600
L.odoratus : .....G..... : 600
L.sylvestris : .....T..... : 600
Vicia craca : .....G..... : 599
ACCTTGGTAGGGTGTGCCaTGATaaATGGTGGTTGTGTGACcCACGAGACCAaTCAtgCgc gCtcTAttGAaTTTGGcCTcTTTT ACCCatATGCGTT

```

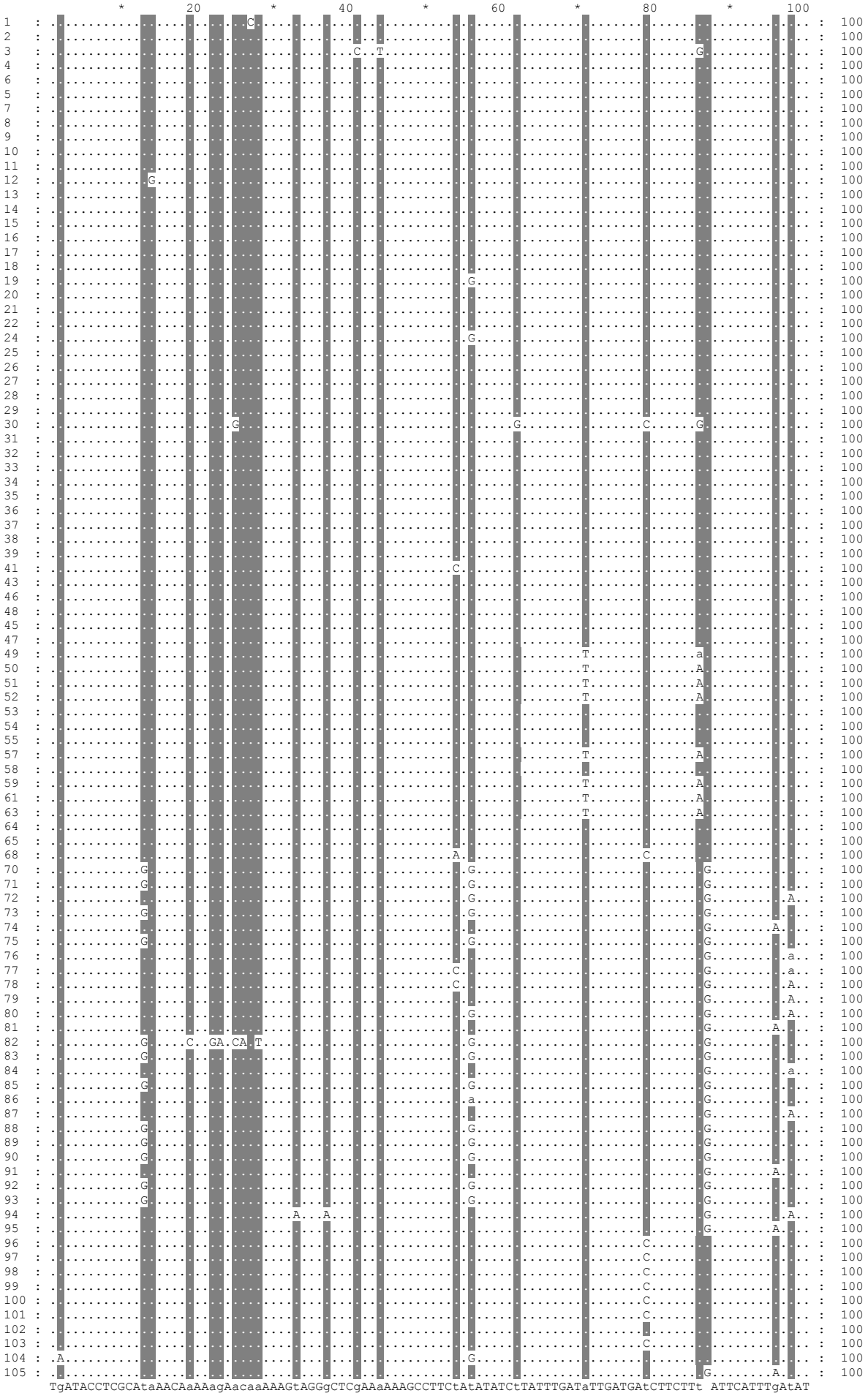
```

*
1      : ..... : 611
2      : ..... : 611
12     : ..... : 611
59     : ..... : 611
97     : ..... : 611
60     : ..... : 611
49     : ..... : 611
81     : ..... : 611
29     : ..... : 611
44     : ..... : 611
93     : .....C..... : 611
38     : ..... : 611
27     : ..... : 611
39     : ..... : 611
61     : .....G..... : 611
14     : ..... : 611
88     : ..... : 611
L.pallescens : ..... : 611
L.filiiformis : .....A..... : 611
L.spathulatus : ..... : 611
L.jepsonii : ..... : 611
L.vernus : ..... : 611
L.alpestris : ..... : 611
L.japonicus : ..... : 611
L.tingitanus : ..... : 611
L.odoratus : ..... : 611
L.sylvestris : ..... : 611
Vicia craca : ..... : 610
TCTAAacGCTc

```

En la base superior se indican la posición de los nucleótidos. Los puntos corresponden a idénticos residuos en toda la secuencia. Con fondo gris se marcan los sitios polimórficos y dentro de ellos las letras indican el sentido del cambio. Los números corresponden a los códigos de la Tabla 1.

Matriz 3. Matriz alineada de la región cloroplástica intergénica trnS-trnG para los análisis de variabilidad realizados en el Capítulo V.



```

1 : ..... : 200
2 : ..... : 200
3 : ..... : 200
4 : ..... : 200
5 : ..... : 200
6 : ..... : 200
7 : ..... : 200
8 : ..... : 200
9 : ..... : 200
10 : ..... : 200
11 : ..... : 200
12 : ..... : 200
13 : ..... : 200
14 : ..... : 200
15 : ..... : 200
16 : ..... : 200
17 : ..... : 200
18 : ..... : 200
19 : ..... : 200
20 : ..... : 200
21 : ..... : 200
22 : ..... : 200
24 : ..... : 200
25 : ..... : 200
26 : ..... : 200
27 : ..... : 200
28 : ..... : 200
29 : ..... : 200
30 : ..... : 200
31 : ..... : 200
32 : ..... : 200
33 : ..... : 200
34 : ..... : 200
35 : ..... : 200
36 : ..... : 200
37 : ..... : 200
38 : ..... : 200
39 : ..... : 200
41 : ..... : 200
43 : ..... : 200
46 : ..... : 200
48 : ..... : 200
45 : ..... : 200
47 : ..... : 200
49 : ..... : 200
50 : ..... : 200
51 : ..... : 200
52 : ..... : 200
53 : ..... : 200
54 : ..... : 200
55 : ..... : 200
57 : ..... : 200
58 : ..... : 200
59 : ..... : 200
61 : ..... : 200
63 : ..... : 200
64 : ..... : 200
65 : ..... : 200
68 : ..... : 200
70 : ..... : 200
71 : ..... : 200
72 : ..... : 200
73 : ..... : 200
74 : ..... : 200
75 : ..... : 200
76 : ..... : 200
77 : ..... : 200
78 : ..... : 200
79 : ..... : 200
80 : ..... : 200
81 : ..... : 200
82 : ..... : 200
83 : ..... : 200
84 : ..... : 200
85 : ..... : 200
86 : ..... : 200
87 : ..... : 200
88 : ..... : 200
89 : ..... : 200
90 : ..... : 200
91 : ..... : 200
92 : ..... : 200
93 : ..... : 200
94 : ..... : 200
95 : ..... : 200
96 : ..... : 200
97 : ..... : 200
98 : ..... : 200
99 : ..... : 200
100 : ..... : 200
101 : ..... : 200
102 : ..... : 200
103 : ..... : 200
104 : ..... : 200
105 : ..... : 200

```

ATCtTATTCaTCTTATCTACCTTTTTTtCtATTTGATTC aATTCTATATTAACT ATAAATatAGAtCaaAtATATATTT TTCTTAGTAATTCtATATA

```

1 : ..... * ..... 220 * ..... 240 * ..... 260 * ..... 280 * ..... 300 : 300
2 : ..... : 300
3 : ..... : 300
4 : ..... : 300
5 : ..... : 300
6 : ..... : 300
7 : ..... : 300
8 : ..... : 300
9 : ..... : 300
10 : ..... : 300
11 : ..... : 300
12 : ..... : 300
13 : ..... : 300
14 : ..... : 300
15 : ..... : 300
16 : ..... : 300
17 : ..... : 300
18 : ..... : 300
19 : ..... : 300
20 : ..... : 300
21 : ..... : 300
22 : ..... : 300
24 : ..... : 300
25 : ..... : 300
26 : ..... : 300
27 : ..... : 300
28 : ..... : 300
29 : ..... : 300
30 : ..... : 300
31 : ..... : 300
32 : ..... : 300
33 : ..... : 300
34 : ..... : 300
35 : ..... : 300
36 : ..... : 300
37 : ..... : 300
38 : ..... : 300
39 : ..... : 300
41 : ..... : 300
43 : ..... : 300
46 : ..... : 300
48 : ..... : 300
45 : ..... : 300
47 : ..... : 300
49 : ..... : 300
50 : ..... : 300
51 : ..... : 300
52 : ..... : 300
53 : ..... : 300
54 : ..... : 300
55 : ..... : 300
57 : ..... : 300
58 : ..... : 300
59 : ..... : 300
61 : ..... : 300
63 : ..... : 300
64 : ..... : 300
65 : ..... : 300
68 : ..... : 300
70 : ..... : 300
71 : ..... : 300
72 : ..... : 300
73 : ..... : 300
74 : ..... : 300
75 : ..... : 300
76 : ..... : 300
77 : ..... : 300
78 : ..... : 300
79 : ..... : 300
80 : ..... : 300
81 : ..... : 300
82 : ..... : 300
83 : ..... : 300
84 : ..... : 300
85 : ..... : 300
86 : ..... : 300
87 : ..... : 300
88 : ..... : 300
89 : ..... : 300
90 : ..... : 300
91 : ..... : 300
92 : ..... : 300
93 : ..... : 300
94 : ..... : 300
95 : ..... : 300
96 : ..... : 300
97 : ..... : 300
98 : ..... : 300
99 : ..... : 300
100 : ..... : 300
101 : ..... : 300
102 : ..... : 300
103 : ..... : 300
104 : ..... : 300
105 : ..... : 300

```

TATTCTAAATACgAtAcTAAATACGATACcGtaTATATaAATACTATACGGTATATAcACTAAAtAaaTAcTTataCTA TA A AATc atcaTTtTtG

```

      *      320      *      340      *      360      *      380      *      400
1 : ..... : 400
2 : ..... : 400
3 : ..... : 400
4 : ..... : 400
5 : ..... : 400
6 : ..... : 400
7 : ..... : 400
8 : ..... : 400
9 : ..... : 400
10 : ..... : 400
11 : ..... : 400
12 : ..... : 400
13 : ..... : 400
14 : ..... : 400
15 : ..... : 400
16 : ..... : 400
17 : ..... : 400
18 : ..... : 400
19 : ..... : 400
20 : ..... : 400
21 : ..... : 400
22 : ..... : 400
24 : ..... : 400
25 : ..... : 400
26 : ..... : 400
27 : ..... : 400
28 : ..... : 400
29 : ..... : 400
30 : ..... : 400
31 : ..... : 400
32 : ..... : 400
33 : ..... : 400
34 : ..... : 400
35 : ..... : 400
36 : ..... : 400
37 : ..... : 400
38 : ..... : 400
39 : ..... : 400
41 : ..... : 400
43 : ..... : 400
46 : ..... : 400
48 : ..... : 400
45 : ..... : 400
47 : ..... : 400
49 : ..... : 400
50 : ..... : 400
51 : ..... : 400
52 : ..... : 400
53 : ..... : 400
54 : ..... : 400
55 : ..... : 400
57 : ..... : 400
58 : ..... : 400
59 : ..... : 400
61 : ..... : 400
63 : ..... : 400
64 : ..... : 400
65 : ..... : 400
68 : ..... : 400
70 : ..... : 400
71 : ..... : 400
72 : ..... G ..... : 400
73 : ..... G ..... : 400
74 : ..... G ..... : 400
75 : ..... G ..... : 400
76 : ..... G ..... : 400
77 : ..... G ..... : 400
78 : ..... G ..... : 400
79 : ..... G ..... : 400
80 : ..... G ..... : 400
81 : ..... G ..... : 400
82 : ..... G ..... : 400
83 : ..... G ..... : 400
84 : ..... G ..... : 400
85 : ..... G ..... : 400
86 : ..... G ..... : 400
87 : ..... G ..... : 400
88 : ..... G ..... : 400
89 : ..... G ..... : 400
90 : ..... G ..... : 400
91 : ..... G ..... : 400
92 : ..... G ..... : 400
93 : ..... G ..... : 400
94 : ..... G ..... : 400
95 : ..... G ..... : 400
96 : ..... G ..... : 400
97 : ..... G ..... : 400
98 : ..... G ..... : 400
99 : ..... G ..... : 400
100 : ..... G ..... : 400
101 : ..... G ..... : 400
102 : ..... G ..... : 400
103 : ..... G ..... : 400
104 : ..... G ..... : 400
105 : ..... G ..... : 400

```

ATTTTCTTTTATTGATTGATCTTCATTGATTCATTGATATATCTTATTCaTcTTTTTCTATTTGATTCATAATTCATATATTACTGATAAATATAGATTC

```

*      420      *      440      *      460      *      480      *      500
1 : ..... : 500
2 : ..... : 500
3 : ..... : 500
4 : ..... : 500
5 : ..... : 500
6 : ..... : 500
7 : ..... : 500
8 : ..... : 500
9 : ..... : 500
10 : ..... : 500
11 : ..... : 500
12 : ..... : 500
13 : ..... : 500
14 : ..... : 500
15 : ..... : 500
16 : ..... : 500
17 : ..... : 500
18 : ..... : 500
19 : ..... : 500
20 : ..... : 500
21 : ..... : 500
22 : ..... : 500
24 : ..... : 500
25 : ..... : 500
26 : ..... : 500
27 : ..... : 500
28 : ..... : 500
29 : ..... : 500
30 : ..... : 500
31 : ..... : 500
32 : ..... : 500
33 : ..... : 500
34 : ..... : 500
35 : ..... : 500
36 : ..... : 500
37 : ..... : 500
38 : ..... : 500
39 : ..... : 500
41 : ..... : 500
43 : ..... : 500
46 : ..... : 500
48 : ..... : 500
45 : ..... : 500
47 : ..... : 500
49 : ..... : 500
50 : ..... : 500
51 : ..... : 500
52 : ..... : 500
53 : ..... : 500
54 : ..... : 500
55 : ..... : 500
57 : ..... : 500
58 : ..... : 500
59 : ..... : 500
61 : ..... : 500
63 : ..... : 500
64 : ..... : 500
65 : ..... : 500
68 : ..... : 500
70 : ..... : 500
71 : ..... : 500
72 : ..... : 500
73 : ..... : 500
74 : ..... : 500
75 : ..... : 500
76 : ..... : 500
77 : ..... : 500
78 : ..... : 500
79 : ..... : 500
80 : ..... : 500
81 : ..... : 500
82 : ..... : 500
83 : ..... : 500
84 : ..... : 500
85 : ..... : 500
86 : ..... : 500
87 : ..... : 500
88 : ..... : 500
89 : ..... : 500
90 : ..... : 500
91 : ..... : 500
92 : ..... : 500
93 : ..... : 500
94 : ..... : 500
95 : ..... : 500
96 : ..... : 500
97 : ..... : 500
98 : ..... : 500
99 : ..... : 500
100 : ..... : 500
101 : ..... : 500
102 : ..... : 500
103 : ..... : 500
104 : ..... : 500
105 : ..... : 500

```

```

AATATATATTTATTCTTAGTAATTCATATATATACTAAATACGATACTGTATATATACTAAATAAATACTTATACTAAATAGAGAATCT TCATTTT GATT

```

```

      *      520      *      540      *      560      *      580      *      600
1 : ..... : 600
2 : ..... : 600
3 : ..... : 600
4 : ..... : 600
5 : ..... : 600
6 : ..... : 600
7 : ..... : 600
8 : ..... : 600
9 : ..... : 600
10 : ..... : 600
11 : ..... : 600
12 : ..... : 600
13 : ..... : 600
14 : ..... : 600
15 : ..... : 600
16 : ..... : 600
17 : ..... : 600
18 : ..... : 600
19 : ..... : 600
20 : ..... : 600
21 : ..... : 600
22 : ..... : 600
24 : ..... : 600
25 : ..... : 600
26 : ..... : 600
27 : ..... : 600
28 : ..... : 600
29 : ..... : 600
30 : ..... : 600
31 : ..... : 600
32 : ..... : 600
33 : ..... : 600
34 : ..... : 600
35 : ..... : 600
36 : ..... : 600
37 : ..... : 600
38 : ..... : 600
39 : ..... : 600
41 : ..... : 600
43 : ..... : 600
46 : ..... : 600
48 : ..... : 600
45 : ..... : 600
47 : ..... : 600
49 : ..... : 600
50 : ..... : 600
51 : ..... : 600
52 : ..... : 600
53 : ..... : 600
54 : ..... : 600
55 : ..... : 600
57 : ..... : 600
58 : ..... : 600
59 : ..... : 600
61 : ..... : 600
63 : ..... : 600
64 : ..... : 600
65 : ..... : 600
68 : ..... : 600
70 : ..... : 600
71 : ..... : 600
72 : ..... : 600
73 : ..... : 600
74 : ..... : 600
75 : ..... : 600
76 : ..... : 600
77 : ..... : 600
78 : ..... : 600
79 : ..... : 600
80 : ..... : 600
81 : ..... : 600
82 : ..... : 600
83 : ..... : 600
84 : ..... : 600
85 : ..... : 600
86 : ..... : 600
87 : ..... : 600
88 : ..... : 600
89 : ..... : 600
90 : ..... : 600
91 : ..... : 600
92 : ..... : 600
93 : ..... : 600
94 : ..... : 600
95 : ..... : 600
96 : ..... : 600
97 : ..... : 600
98 : ..... : 600
99 : ..... : 600
100 : ..... : 600
101 : ..... : 600
102 : ..... : 600
103 : ..... : 600
104 : ..... : 600
105 : ..... : 600
TTC TTTATTGATTGATCTTC TTTGATTCATTGATAT TCTTATTCATCTT TTTCTATTGATTCTa TTCTATATTAAC TGATAAATATAGATTCA

```



```

*      620      *      640      *      660      *      680      *      700
1 : ..... : 700
2 : ..... : 700
3 : ..... : 700
4 : ..... : 700
5 : ..... : 700
6 : ..... : 700
7 : ..... : 700
8 : ..... : 700
9 : ..... : 700
10 : ..... : 700
11 : ..... : 700
12 : ..... : 700
13 : ..... : 700
14 : ..... : 700
15 : ..... : 700
16 : ..... : 700
17 : ..... : 700
18 : ..... : 700
19 : ..... : 700
20 : ..... : 700
21 : ..... : 700
22 : ..... : 700
24 : ..... : 700
25 : ..... : 700
26 : ..... : 700
27 : ..... : 700
28 : ..... : 700
29 : ..... : 700
30 : ..... : 700
31 : ..... : 700
32 : ..... : 700
33 : ..... : 700
34 : ..... : 700
35 : ..... : 700
36 : ..... : 700
37 : ..... : 700
38 : ..... : 700
39 : ..... : 700
41 : ..... : 700
43 : ..... : 700
46 : ..... : 700
48 : ..... : 700
45 : ..... : 700
47 : ..... : 700
49 : ..... : 700
50 : ..... : 700
51 : ..... : 700
52 : ..... : 700
53 : ..... : 700
54 : ..... : 700
55 : ..... : 700
57 : ..... : 700
58 : ..... : 700
59 : ..... : 700
61 : ..... : 700
63 : ..... : 700
64 : ..... : 700
65 : ..... : 700
68 : ..... : 700
70 : ..... : 700
71 : ..... : 700
72 : ..... : 700
73 : ..... : 700
74 : ..... : 700
75 : ..... : 700
76 : ..... : 700
77 : ..... : 700
78 : ..... : 700
79 : ..... : 700
80 : ..... : 700
81 : ..... : 700
82 : ..... : 700
83 : ..... : 700
84 : ..... : 700
85 : ..... : 700
86 : ..... : 700
87 : ..... : 700
88 : ..... : 700
89 : ..... : 700
90 : ..... : 700
91 : ..... : 700
92 : ..... : 700
93 : ..... : 700
94 : ..... : 700
95 : ..... : 700
96 : ..... : 700
97 : ..... : 700
98 : ..... : 700
99 : ..... : 700
100 : ..... : 700
101 : ..... : 700
102 : ..... : 700
103 : ..... : 700
104 : ..... : 700
105 : ..... : 700

```

AATATATATTTATTCTTAGTAATTC ATATATACTAAATACGATACTGTATATATACTAATAA TACTTATACTAAATAGAGAA CT TCATTTTTGATT

```

*       720       *       740       *       760       *       780       *       800
1 : ..... : 800
2 : ..... : 800
3 : ..... : 800
4 : ..... : 800
5 : ..... : 800
6 : ..... : 800
7 : ..... : 800
8 : ..... : 800
9 : ..... : 800
10 : ..... : 800
11 : ..... : 800
12 : ..... : 800
13 : ..... : 800
14 : ..... : 800
15 : ..... : 800
16 : ..... : 800
17 : ..... : 800
18 : ..... : 800
19 : ..... : 800
20 : ..... : 800
21 : ..... : 800
22 : ..... : 800
24 : ..... : 800
25 : ..... : 800
26 : ..... : 800
27 : ..... : 800
28 : ..... : 800
29 : ..... : 800
30 : ..... : 800
31 : ..... : 800
32 : ..... : 800
33 : ..... : 800
34 : ..... : 800
35 : ..... : 800
36 : ..... : 800
37 : ..... : 800
38 : ..... : 800
39 : ..... : 800
41 : ..... : 800
43 : ..... : 800
46 : ..... : 800
48 : ..... : 800
45 : ..... : 800
47 : ..... : 800
49 : ..... : 800
50 : ..... : 800
51 : ..... : 800
52 : ..... : 800
53 : ..... : 800
54 : ..... : 800
55 : ..... : 800
57 : ..... : 800
58 : ..... : 800
59 : ..... : 800
61 : ..... : 800
63 : ..... : 800
64 : ..... : 800
65 : ..... : 800
68 : ..... : 800
70 : ..... G ..... : 800
71 : ..... C ..... : 800
72 : ..... C ..... : 800
73 : ..... C ..... : 800
74 : ..... C ..... : 800
75 : ..... G ..... : 800
76 : ..... C ..... : 800
77 : ..... C ..... : 800
78 : ..... C ..... : 800
79 : ..... C ..... : 800
80 : ..... C ..... : 800
81 : ..... C ..... : 800
82 : ..... C ..... : 800
83 : ..... C ..... : 800
84 : ..... C ..... : 800
85 : ..... C ..... : 800
86 : ..... C ..... : 800
87 : ..... C ..... : 800
88 : ..... C ..... : 800
89 : ..... C ..... : 800
90 : ..... C ..... : 800
91 : ..... C ..... : 800
92 : ..... C ..... : 800
93 : ..... C ..... : 800
94 : ..... C ..... : 800
95 : ..... C ..... : 800
96 : ..... C ..... : 800
97 : ..... C ..... : 800
98 : ..... C ..... : 800
99 : ..... C ..... : 800
100 : ..... C ..... : 800
101 : ..... C ..... : 800
102 : ..... C ..... : 800
103 : ..... C ..... : 800
104 : ..... C ..... : 800
105 : ..... C ..... : 800

```

TTCTTTTATTGATTGATCTTCATTGATTCATTGATATACTTATTCATCTTTTTTCTATTGATTCCTAATT TATATTAAC TGATAAATATAGATTAA

```

      *      820      *      840      *      860      *      880      *      900
1 : ..... : 900
2 : ..... : 900
3 : ..... : 900
4 : ..... : 900
5 : ..... : 900
6 : ..... : 900
7 : ..... : 900
8 : ..... : 900
9 : ..... : 900
10 : ..... : 900
11 : ..... : 900
12 : ..... : 900
13 : ..... : 900
14 : ..... : 900
15 : ..... : 900
16 : ..... : 900
17 : ..... : 900
18 : ..... : 900
19 : ..... : 900
20 : ..... : 900
21 : ..... : 900
22 : ..... : 900
24 : ..... : 900
25 : ..... : 900
26 : ..... : 900
27 : ..... : 900
28 : ..... : 900
29 : ..... : 900
30 : ..... : 900
31 : ..... : 900
32 : ..... : 900
33 : ..... : 900
34 : ..... : 900
35 : ..... : 900
36 : ..... : 900
37 : ..... : 900
38 : ..... : 900
39 : ..... : 900
41 : ..... : 900
43 : ..... : 900
46 : ..... : 900
48 : ..... : 900
45 : ..... : 900
47 : ..... : 900
49 : ..... : 900
50 : ..... : 900
51 : ..... : 900
52 : ..... : 900
53 : ..... : 900
54 : ..... : 900
55 : ..... : 900
57 : ..... : 900
58 : ..... : 900
59 : ..... : 900
61 : ..... : 900
63 : ..... : 900
64 : ..... : 900
65 : ..... : 900
68 : ..... : 900
70 : ..... : 900
71 : ..... : 900
72 : ..... : 900
73 : ..... : 900
74 : ..... : 900
75 : ..... : 900
76 : ..... : 900
77 : ..... : 900
78 : ..... : 900
79 : ..... : 900
80 : ..... : 900
81 : ..... : 900
82 : ..... : 900
83 : ..... : 900
84 : ..... : 900
85 : ..... : 900
86 : ..... : 900
87 : ..... : 900
88 : ..... : 900
89 : ..... : 900
90 : ..... : 900
91 : ..... : 900
92 : ..... : 900
93 : ..... : 900
94 : ..... : 900
95 : ..... : 900
96 : ..... : 900
97 : ..... : 900
98 : ..... : 900
99 : ..... : 900
100 : ..... : 900
101 : ..... : 900
102 : ..... : 900
103 : ..... : 900
104 : ..... : 900
105 : ..... : 900

```

ATATATATTTATCTTAGTAATTCATATATACTAAATACGACTGTatataTActaAtaaaTACTtAt ctaaataga AatcttTTTTTctTTTTTa

```

1 : * 920 * 940 * 960 * 980 * 1000 : 1000
2 : .....A.....T.....C : 1000
3 : .....A.....T.....C : 1000
4 : .....A.....T.....C : 1000
5 : .....A.....T.....C : 1000
6 : .....A.....T.....C : 1000
7 : .....A.....T.....C : 1000
8 : .....A.....T.....C : 1000
9 : .....A.....T.....C : 1000
10 : .....A.....T.....C : 1000
11 : .....A.....T.....C : 1000
12 : .....A.....T.....C : 1000
13 : .....A.....T.....C : 1000
14 : .....A.....T.....C : 1000
15 : .....A.....T.....C : 1000
16 : .....A.....T.....C : 1000
17 : .....A.....T.....C : 1000
18 : .....A.....T.....C : 1000
19 : .....A.....T.....C : 1000
20 : .....A.....T.....C : 1000
21 : .....A.....T.....C : 1000
22 : .....A.....T.....C : 1000
24 : .....A.....T.....C : 1000
25 : .....A.....T.....C : 1000
26 : .....A.....T.....C : 1000
27 : .....A.....T.....C : 1000
28 : .....A.....T.....C : 1000
29 : .....A.....T.....C : 1000
30 : .....G.....T.....C : 1000
31 : .....A.....T.....C : 1000
32 : .....A.....T.....C : 1000
33 : .....A.....T.....C : 1000
34 : .....A.....T.....C : 1000
35 : .....A.....T.....C : 1000
36 : .....A.....T.....C : 1000
37 : .....A.....T.....C : 1000
38 : .....A.....T.....C : 1000
39 : .....A.....T.....C : 1000
41 : .....A.....T.....C : 1000
43 : .....A.....T.....C : 1000
46 : .....A.....T.....C : 1000
48 : .....A.....T.....C : 1000
45 : .....A.....T.....C : 1000
47 : .....A.....T.....C : 1000
49 : .....A.....T.....C : 1000
50 : .....A.....T.....C : 1000
51 : .....A.....T.....C : 1000
52 : .....A.....T.....C : 1000
53 : .....A.....T.....C : 1000
54 : .....A.....T.....C : 1000
55 : .....A.....T.....C : 1000
57 : .....A.....T.....C : 1000
58 : .....A.....T.....C : 1000
59 : .....A.....T.....C : 1000
61 : .....A.....T.....C : 1000
63 : .....A.....T.....C : 1000
64 : .....A.....T.....C : 1000
65 : .....A.....T.....C : 1000
68 : .....A.....T.....C : 1000
70 : .....A.....T.....C : 1000
71 : .....A.....T.....C : 1000
72 : .....A.....T.....C : 1000
73 : .....A.....T.....C : 1000
74 : .....A.....T.....C : 1000
75 : .....A.....T.....C : 1000
76 : .....ATT..T..TT..CTG...AAGAA..G : 1000
77 : .....ATT..T..TT..CTG...AAGAA..G : 1000
78 : .....ATT..T..TT..CTG...AAGAA..G : 1000
79 : .....ATT..T..TT..CTG...AAGAA..G : 1000
80 : .....ATT..T..TT..CTG...AAGAA..G : 1000
81 : .....ATT..T..TT..CTG...AAGAA..G : 1000
82 : .....A.....G.....T.....C : 1000
83 : .....A.....G.....T.....C : 1000
84 : .....A.....G.....T.....C : 1000
85 : .....G.....T.....C : 1000
86 : .....G.....T.....C : 1000
87 : .....G.....T.....C : 1000
88 : .....G.....T.....C : 1000
89 : .....G.....T.....C : 1000
90 : .....G.....T.....C : 1000
91 : .....G.....T.....C : 1000
92 : .....G.....T.....C : 1000
93 : .....G.....T.....C : 1000
94 : .....A..A.....ATT..T..TT..CTG...AAGAA..G : 1000
95 : .....A..A.....ATT..T..TT..CTG...AAGAA..G : 1000
96 : .....A..A.....ATT..T..TT..CTG...AAGAA..G : 1000
97 : .....A..A.....ATT..T..TT..CTG...AAGAA..G : 1000
98 : .....A..A.....ATT..T..TT..CTG...AAGAA..G : 1000
99 : .....A..A.....ATT..T..TT..CTG...AAGAA..G : 1000
100 : .....A..A.....ATT..T..TT..CTG...AAGAA..G : 1000
101 : .....A..A.....ATT..T..TT..CTG...AAGAA..G : 1000
102 : .....GC.....T.....C : 1000
103 : .....GC.....T.....C : 1000
104 : .....GC.....T.....C : 1000
105 : .....T.....C : 1000

```

gTTTGTTTTTATCCAACCAgAgTCCAGCTAGGTActGctCTTTTtTCCCATGAATCcTGGAAATTGATTTTTCTGTttaaGAatgaTtgaTTTtctctgTa

```

1 : A : 1100
2 : A : 1100
3 : TG : 1100
4 : A : 1100
5 : a : 1100
6 : A : 1100
7 : A : 1100
8 : A : 1100
9 : C : 1100
10 : A : 1100
11 : A : 1100
12 : : 1100
13 : : 1100
14 : : 1100
15 : : 1100
16 : A : 1100
17 : : 1100
18 : : 1100
19 : C : 1100
20 : : 1100
21 : G : 1100
22 : : 1100
24 : C : 1100
25 : : 1100
26 : C : 1100
27 : G : 1100
28 : C : 1100
29 : C : 1100
30 : : 1100
31 : C : 1100
32 : : 1100
33 : C : 1100
34 : C : 1100
35 : C : 1100
36 : C : 1100
37 : C : 1100
38 : C : 1100
39 : C : 1100
41 : C : 1100
43 : : 1100
46 : G : 1100
48 : G : 1100
45 : G : 1100
47 : G : 1100
49 : : 1100
50 : : 1100
51 : : 1100
52 : : 1100
53 : : 1100
54 : : 1100
55 : : 1100
57 : : 1100
58 : : 1100
59 : : 1100
61 : : 1100
63 : : 1100
64 : C : 1100
65 : : 1100
68 : : 1100
70 : C : 1100
71 : C : 1100
72 : C : 1100
73 : C : 1100
74 : : 1100
75 : C : 1100
76 : : 1100
77 : C : 1100
78 : C : 1100
79 : : 1100
80 : C : 1100
81 : : 1100
82 : C : 1100
83 : C : 1100
84 : : 1100
85 : C : 1100
86 : C : 1100
87 : : 1100
88 : C : 1100
89 : C : 1100
90 : C : 1100
91 : G : 1100
92 : C : 1100
93 : C : 1100
94 : : 1100
95 : G : 1100
96 : : 1100
97 : C : 1100
98 : : 1100
99 : : 1100
100 : C : 1100
101 : : 1100
102 : C : 1100
103 : : 1100
104 : C : 1100
105 : AG : 1100

```

tcAGATTGAAACAACTTgtaATT ATTCAAAcattTGAATatGATCaAaCaAaAtAAAActAACTTtGTGATCATatTaTATCATaCGAATTTATCA

```

1 : ..... : 1200
2 : ..... : 1200
3 : ..... : 1200
4 : ..... : 1200
5 : ..... : 1200
6 : ..... : 1200
7 : ..... : 1200
8 : ..... : 1200
9 : ..... : 1200
10 : ..... : 1200
11 : ..... : 1200
12 : ..... : 1200
13 : ..... : 1200
14 : ..... : 1200
15 : ..... : 1200
16 : ..... : 1200
17 : ..... : 1200
18 : ..... : 1200
19 : ..... : 1200
20 : ..... : 1200
21 : ..... : 1200
22 : ..... : 1200
24 : ..... : 1200
25 : ..... : 1200
26 : ..... : 1200
27 : ..... : 1200
28 : ..... : 1200
29 : ..... : 1200
30 : ..... : 1200
31 : ..... : 1200
32 : ..... : 1200
33 : ..... : 1200
34 : ..... : 1200
35 : ..... : 1200
36 : ..... : 1200
37 : ..... : 1200
38 : ..... : 1200
39 : ..... : 1200
41 : ..... : 1200
43 : ..... : 1200
46 : ..... : 1200
48 : ..... : 1200
45 : ..... : 1200
47 : ..... : 1200
49 : ..... : 1200
50 : ..... : 1200
51 : ..... : 1200
52 : ..... : 1200
53 : ..... : 1200
54 : ..... : 1200
55 : ..... : 1200
57 : ..... : 1200
58 : ..... : 1200
59 : ..... : 1200
61 : ..... : 1200
63 : ..... : 1200
64 : ..... : 1200
65 : ..... : 1200
68 : ..... : 1200
70 : ..... : 1200
71 : ..... : 1200
72 : ..... : 1200
73 : ..... : 1200
74 : ..... : 1200
75 : ..... : 1200
76 : ..... : 1200
77 : ..... : 1200
78 : ..... : 1200
79 : ..... : 1200
80 : ..... : 1200
81 : ..... : 1200
82 : ..... : 1200
83 : ..... : 1200
84 : ..... : 1200
85 : ..... : 1200
86 : ..... : 1200
87 : ..... : 1200
88 : ..... : 1200
89 : ..... : 1200
90 : ..... : 1200
91 : ..... : 1200
92 : ..... : 1200
93 : ..... : 1200
94 : ..... : 1200
95 : ..... : 1200
96 : ..... : 1200
97 : ..... : 1200
98 : ..... : 1200
99 : ..... : 1200
100 : ..... : 1200
101 : ..... : 1200
102 : ..... : 1200
103 : ..... : 1200
104 : ..... : 1200
105 : ..... : 1200

```

GGtAAcGTATcTAAAAAAGAAAtAgAACTATGGATTCTtGCaTAAtgCATTTTTgTGTtATGAATTTaGTTTaGTAATTTTGTcGAGAtcTATGCTGTC

```

1 : ..... * 1220 * 1240 * 1260 * 1280 * 1300 : 1300
2 : ..... A ..... : 1300
3 : ..... a ..... : 1300
4 : ..... A ..... : 1300
5 : ..... A ..... : 1300
6 : ..... A ..... : 1300
7 : ..... A ..... : 1300
8 : ..... A ..... : 1300
9 : ..... A ..... : 1300
10 : ..... A ..... : 1300
11 : ..... A ..... : 1300
12 : ..... : 1300
13 : ..... : 1300
14 : ..... A ..... : 1300
15 : ..... : 1300
16 : ..... A ..... : 1300
17 : ..... : 1300
18 : ..... : 1300
19 : ..... C ..... : 1300
20 : ..... : 1300
21 : ..... : 1300
22 : ..... : 1300
24 : ..... : 1300
25 : ..... : 1300
26 : ..... g ..... : 1300
27 : ..... g ..... : 1300
28 : ..... : 1300
29 : ..... : 1300
30 : ..... g ..... T ..... : 1300
31 : ..... g ..... T ..... : 1300
32 : ..... g ..... T ..... : 1300
33 : ..... g ..... T ..... : 1300
34 : ..... g ..... T ..... : 1300
35 : ..... g ..... T ..... : 1300
36 : ..... g ..... T ..... : 1300
37 : ..... g ..... T ..... : 1300
38 : ..... g ..... T ..... : 1300
39 : ..... g ..... : 1300
41 : ..... g ..... A ..... : 1300
43 : ..... : 1300
46 : ..... : 1300
48 : ..... : 1300
45 : ..... : 1300
47 : ..... : 1300
49 : ..... : 1300
50 : ..... : 1300
51 : ..... : 1300
52 : ..... : 1300
53 : ..... : 1300
54 : ..... : 1300
55 : ..... : 1300
57 : ..... C ..... : 1300
58 : ..... C ..... : 1300
59 : ..... C ..... : 1300
61 : ..... C ..... : 1300
63 : ..... C ..... : 1300
64 : ..... g ..... : 1300
65 : ..... C ..... : 1300
68 : ..... : 1300
70 : ..... : 1300
71 : ..... : 1300
72 : ..... : 1300
73 : ..... : 1300
74 : ..... : 1300
75 : ..... : 1300
76 : ..... : 1300
77 : ..... A ..... : 1300
78 : ..... A ..... : 1300
79 : ..... : 1300
80 : ..... C ..... : 1300
81 : ..... C ..... A ..... C ..... : 1300
82 : ..... : 1300
83 : ..... : 1300
84 : ..... : 1300
85 : ..... : 1300
86 : ..... : 1300
87 : ..... : 1300
88 : ..... : 1300
89 : ..... : 1300
90 : ..... : 1300
91 : ..... : 1300
92 : ..... : 1300
93 : ..... : 1300
94 : ..... A ..... : 1300
95 : ..... : 1300
96 : ..... : 1300
97 : ..... : 1300
98 : ..... : 1300
99 : ..... : 1300
100 : ..... : 1300
101 : ..... : 1300
102 : ..... : 1300
103 : ..... : 1300
104 : ..... : 1300
105 : ..... : 1300

```

AAAAATACCTTCCaAAAAATCCaAAAAATAAAATCCAAAAAGGGAATTTGCCCCCTTcCTAAATTTcATTAGGGGGCCcTTACGACGAAACaTGTAAaCAC

```

1 : ..... : 1372
2 : ..... : 1372
3 : ..... : 1372
4 : ..... : 1372
6 : ..... : 1372
5 : ..... : 1372
7 : ..... : 1372
8 : ..... : 1372
9 : ..... : 1372
10 : ..... : 1372
11 : ..... : 1372
12 : ..... : 1372
13 : ..... : 1372
14 : ..... : 1372
15 : ..... : 1372
16 : ..... : 1372
17 : ..... : 1372
18 : ..... : 1372
19 : ..... : 1372
20 : ..... : 1372
21 : ..... : 1372
22 : ..... : 1372
24 : ..... : 1372
25 : ..... : 1372
26 : ..... : 1372
27 : ..... : 1372
28 : ..... : 1372
29 : ..... : 1372
30 : ..... : 1372
31 : ..... : 1372
32 : ..... : 1372
33 : ..... : 1372
34 : ..... : 1372
35 : ..... : 1372
36 : ..... : 1372
37 : ..... : 1372
38 : ..... : 1372
39 : ..... : 1372
41 : ..... : 1372
43 : ..... : 1372
46 : ..... : 1372
48 : ..... : 1372
45 : ..... : 1372
47 : ..... : 1372
49 : ..... : 1372
50 : ..... : 1372
51 : ..... : 1372
52 : ..... : 1372
53 : ..... : 1372
54 : ..... : 1372
55 : ..... : 1372
57 : ..... : 1372
58 : ..... : 1372
59 : ..... : 1372
61 : ..... : 1372
63 : ..... : 1372
64 : ..... : 1372
65 : ..... : 1372
68 : ..... : 1372
70 : ..... : 1372
71 : ..... : 1372
72 : ..... : 1372
73 : ..... : 1372
74 : ..... : 1372
75 : ..... : 1372
76 : ..... : 1372
77 : ..... : 1372
78 : ..... : 1372
79 : ..... : 1372
80 : ..... : 1372
81 : ..... : 1372
82 : ..... : 1372
83 : ..... : 1372
84 : ..... : 1372
85 : ..... : 1372
86 : ..... : 1372
87 : ..... : 1372
88 : ..... : 1372
89 : ..... : 1372
90 : ..... : 1372
91 : ..... : 1372
92 : ..... : 1372
93 : ..... : 1372
94 : ..... : 1372
95 : ..... : 1372
96 : ..... : 1372
97 : ..... : 1372
98 : ..... : 1372
99 : ..... : 1372
100 : ..... : 1372
101 : ..... : 1372
102 : ..... : 1372
103 : ..... : 1372
104 : ..... : 1372
105 : ..... : 1372

```

tCtaTTTATCAtAAcTGcACCTAtTTCATAATTATGActGATTCCcTtGTTcGACAAAAGATCTtTTaTAT

En la base superior se indican la posición de los nucleótidos. Los puntos corresponden a idénticos residuos en toda la secuencia. Con fondo gris se marcan los sitios polimórficos y dentro de ellos las letras indican el sentido del cambio. Los números corresponden a los códigos de la Tabla 1.

