TESIS DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLOGICAS

ESTUDIO DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA POBLACIONAL DE *ASPIDOSPERMA QUEBRACHO BLANCO* SCHLTDL. EN CHACO ÁRIDO

por

Lic. María Belén Torres Basso

Directora: Dra. Liliana E. del Carmen Ciuffo
Co-Directora: Dra. Gladys M. Ciuffo

Laboratorio de Biología Molecular. Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia.
Universidad Nacional de San Luis

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

Córdoba, Argentina

2014

COMISIÓN ASESORA

Dr. Gabriel Bernardello, Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

Dr. José Luis Vesprini, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Rosario, Argentina.

Dra. Liliana Eugenia Ciuffo, Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia, Universidad Nacional de San Luis, Argentina.

DEFENSA ORAL Y PÚBLICA

Lugar y Fecha:

Calificación:

TRIBUNAL

Firma: ……..Aclaración: …….

Firma: ……..Aclaración: …….

Firma: ……..Aclaración: …….

DEDICATORIA

A mi esposo, Sergio, que ha sido el impulso durante toda mi carrera y el pilar principal para la culminación de la misma, que con su apoyo constante y amor incondicional ha sido amigo y compañero inseparable, calma y consejo en todo momento.

A mis hijitos Josecito y Lupe, por ser lo más valioso que Dios me ha regalado, mi alegría, por iluminar con sus sonrisas y la razón que me impulsa cada día.

A mi mamá, que desde el Cielo sigue guiando mis pasos.

AGRADECIMIENTOS

A mi Directora de Tesis, la Dra. Liliana Ciuffo, por permitirme formar parte de su grupo de investigación, por darme la oportunidad de crecer.

A mi Co-directora, la Dra. Gladys Ciuffo, por su ejemplo y sus enseñanzas.

Al Dr. Gabriel Bernardello y al Dr. José Luis Vesprini, miembros de la Comisión Asesora, por el tiempo y la dedicación en evaluar esta tesis, y por aportar sugerencias para mejorarla.

A la Dra. Marina Chiappero por el tiempo dedicado a la evaluación de esta Tesis Doctoral, sus comentarios y correcciones al manuscrito, han contribuido a mejorarla sustancialmente.

A la Universidad Nacional de San Luis, por brindarme el espacio y la infraestructura donde desarrollar este trabajo.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), por el otorgamiento de la Beca Doctoral con la cual se realizó esta tesis.

A la Dra. Alicia Barchuk y su equipo, por la colaboración y compañía en la toma de muestras en Quebracho de la Legua y en Chancaní.

A la Lic. Carla Rueda y a la Ing. Ftal. Adriana T. Gómez (INTA Santiago del Estero) por recibirme y colaborar desinteresadamente en la toma de muestras en Santiago del Estero.

A Eugenia Haro e Ivana Palacio, Secretarias del Doctorado, por su paciencia y amabilidad en responder cada una de mis dudas, por su constante disposición.

A mi papá, mi tía Paty, mi hermano, cuñada y sobrinos, por apoyarme a la distancia.

A toda la gran familia Basso, por tanto amor. En especial, a mis tías “cordobesas”, Mary y Zulma, por ayudarme en cada paso de este proyecto.

A mi familia puntana, especialmente a Olga por su paciencia y amor.

A mis amigos, especialmente a Fátima, Miguel, Érica, Juan, y los peques, por ser más que amigos, hermanos.

A Cecilia María Shortrede, amiga y artista, por los dibujos a lápiz que embellecen esta tesis.

A mis compañeros del Área de Biología Molecular de la UNSL, en especial a la Dra. Susana Sanchez, Dra. María Elena Arce, Dr. Leonardo Seguín, Dr. Sergio Alvarez, Dra. Emilse Sanchez, Dra. Susana Siewert, Dra. Pilar Ferraris, Dr. Arturo Gómez Barroso, Lic. Helga Blanco y Lic. Natalia Carmona, por el tiempo que dedicaron a ayudarme y aconsejarme, por las charlas y los mates que hacen más fácil este camino.

PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA TESIS

TORRES BASSO MB, CIUFFO GM & CIUFFO LEC. 2008. Diversidad genética poblacional de *Aspidosperma quebracho-blanco* Schltdl. en áreas protegidas del Parque Chaqueño, San Luis. En: Libro de Flora Nativa. Sección F- Genética, mejoramiento y biotecnología. 309 pp. Páginas 123-140 pp. ISBN 978-987-510-079-4.

INDICE DE CONTENIDOS

COMISIÓN ASESORA ..... **i**

DEDICATORIA ..... **ii**

AGRADECIMIENTOS ..... **iii**

PUBLICACIONES DERIVADAS DE ESTA TESIS ..... **v**

ÍNDICE ..... **vi**

ÍNDICE DE TABLAS **1**

ÍNDICE DE FIGURAS **3**

ABREVIATURAS **8**

RESUMEN **10**

SUMMARY **12**

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN **14**

I.1. FUNDAMENTACIÓN Y RELEVANCIA DEL ESTUDIO 14

I.2. OBJETIVO GENERAL 17

CAPÍTULO II: ANTECEDENTES **18**

II.1. EL GRAN CHACO AMERICANO 18

II.2. GENERALIDADES DE *ASPIDOSPERMA QUEBRACHO-BLANCO* SCHLTD. 21

II.2.1. Taxonomía 21

II.2.2. Descripción 22

II.2.3. Distribución y Ecología 24

II.2.4. Estrategias de reproducción 24

II.2.4.1. Reproducción sexual 24

II.2.4.2. Reproducción vegetativa 26

II.2.5. Usos madereros y medicinales 27

II.3. CONSERVACIÓN DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA DE BOSQUES NATIVOS 29

II.4. AMPLIFICACIÓN AL AZAR DE FRAGMENTOS POLIMÓRFICOS DE ADN (RAPD) 31

II.4.1. Repetitividad de los patrones RAPDs 34

II.5. GENÉTICA POBLACIONAL 35

II.5.1. Equilibrio de Hardy-Weinberg 35

II.5.2. Estructura genética poblacional 36

II.6. VARIACIÓN DEL METABOLISMO SECUNDARIO POR EL AMBIENTE 38

II.7. ALCALOIDES EN EL GÉNERO *ASPIDOSPERMA* 43

II.7.1. Biosíntesis de AMIS – generalidades 44

II.8. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS ESPECÍFICOS 47

II.8.1. Hipótesis 47

II.8.2. Objetivos específicos 47

CAPÍTULO III: MATERIALES Y MÉTODOS 48

III.1. SITIOS EXPERIMENTALES 48

III.1.1. Reserva Natural Provincial Quebracho de la Legua 50

III.1.2. San Jerónimo 52

III.1.3. Parque Provincial Bajo de Véliz 54

III.1.4. Parque Natural Provincial y Reserva Forestal Natural Chancaní 57

III.1.5. Campo Experimental INTA La María - Santiago del Estero 60

III.2. OBTENCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL 63

III.3. EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS 63

III.3.1. Extracción de ADN genómico 63

III.3.1.1. Consideraciones 63

III.3.1.2. Método de Doyle & Doyle (1987) 65

III.3.2. Extracción de ARN 66

III.3.2.1. Protocolo experimental 67

III.3.3. Cuantificación de ácidos nucleicos 67

III.4. CONDICIONES DE AMPLIFICACIÓN MEDIANTE RAPD..... 68

III.5. ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA 69

III.5.1. Control de integridad de ADN 69

III.5.2. Control de integridad de ARN 69

III.5.3. Electroforesis de los productos RAPDs 70

III.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS DE LOS PATRONES RAPDS 71

III.6.1. Análisis de agrupamiento 71

III.6.2. Análisis de coordenadas principales 72

III.6.3. Análisis de la estructura genética poblacional 72

III.6.3.1. Índice de Shannon-Weaver 72

III.6.3.2. Análisis de la Varianza Molecular 73

III.6.3.3. Determinación de G_{ST} y Flujo génico (Nm) 74

III.6.3.4. Test de Mantel..... 75

III.7. CARACTERIZACIÓN POR SECUENCIACIÓN DE BANDAS OBTENIDAS COMO MARCADORES RAPDS 77

III.7.1. Selección y purificación de productos RAPDs de interés 77

III.7.2. Subclonado de los productos de PCR 77

III.7.2.1. Ligación del fragmento al plásmido pGem-T-Easy 78

III.7.2.2. Preparación de bacterias competentes 79

III.7.2.3. Transformación de bacterias competentes 79

III.7.3. Minipreparación de ADN plasmídico 80

III.7.4. Verificación de la presencia del inserto 82

III.7.5. Secuenciación 83

III.7.5.1. Confirmación de secuencias 83

III.7.6. Diseño de *primers* específicos 84

III.7.7. Alineamiento de secuencias 84

III.7.7.1. Análisis de homología con secuencias conocidas 85

III.7.7.2. Análisis de alineamiento múltiple 85

III.8. RT-PCR 86

III.8.1. Selección de *primers* para la amplificación de TDC, STR y SGD ... 88

III.8.2. RT-PCR de *Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH)* ... 89

III.8.3. RT-PCR de *Triptofano decarboxilasa (TDC)* 90

III.8.4. RT-PCR de *Estrictosidina sintasa (STR)* 90

III.8.5. RT-PCR de *Estrictosidina β-D-glucosidasa (SGD)* 91

III.8.6. Análisis de los productos de RT-PCR 91

CAPÍTULO IV: RESULTADOS 92

PARTE I: DIVERSIDAD GENÉTICA DE *A. QUEBRACHO-BLANCO* MEDIANTE EL USO DE MARCADORES MOLECULARES RAPDS 93

IV.1. ANÁLISIS DE LOS PATRONES RAPDS 93

IV.2. ANÁLISIS ESTADÍSTICO 97

IV.2.1. Análisis de agrupamiento 97

IV.2.2. Análisis de coordenadas principales 100

IV.2.3. Estructura genética poblacional 101

PARTE II: CARACTERIZACIÓN POR SECUENCIACIÓN DE BANDAS OBTENIDAS COMO MARCADORES RAPDS 108

IV.3. SELECCIÓN DE PRODUCTOS RAPDS DE INTERÉS 108

IV.4. VERIFICACIÓN DE LA PRESENCIA DEL INSERTO 108

IV.5. SECUENCIACIÓN DE LOS PRODUCTOS RAPDS SELECCIONADOS 109

IV.6. ANÁLISIS DE HOMOLOGÍA CON SECUENCIAS CONOCIDAS 113

IV.6.1. Marcador B1200 113

IV.6.1.1. Alineamiento múltiple del marcador B1200 117

IV.6.2. Marcador B600 117

IV.6.1.2. Alineamiento múltiple del marcador B600 118

IV.7. PRESENCIA DE LOS MARCADORES SCAR 119

IV.7.1. Detección de contaminación 121

IV.8. AMPLIFICACIÓN DE LOS MARCADORES SCAR EN REACTIVOS LIBRES DE CONTAMINACIÓN 122

PARTE III: DETERMINAR EL NIVEL DE EXPRESIÓN DE GENES QUE CODIFICAN ENZIMAS INVOLUCRADAS EN LA VÍA DE SÍNTESIS DE ALCALOIDES 121

IV.9. EXTRACCIÓN DE ARN DE *A. quebracho-blanco* 124

IV.10. ANÁLISIS POR RT-PCR 125

IV.10.1. Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) 125

IV.10.2. Enzimas participantes en la biosíntesis de AMIs 126

CAPÍTULO V: DISCUSIÓN 129

V.1. DIVERSIDAD GENÉTICA DE *A. quebracho-blanco* MEDIANTE EL USO DE MARCADORES RAPDS 129

V.1.1. Implicaciones para la conservación 135

V.1.1.1. Conservación in situ: las áreas protegidas como unidades de conservación..... 136

V.2. CARACTERIZACIÓN POR SECUENCIACIÓN DE BANDAS OBTENIDAS COMO MARCADORES RAPDS. 137

V.3. DETERMINAR EL NIVEL DE EXPRESIÓN DE GENES QUE CODIFICAN ENZIMAS INVOLUCRADAS EN LA VÍA DE SÍNTESIS DE ALCALOIDES 141

CAPÍTULO VI: CONCLUSIONES 143

CAPÍTULO VII: BIBLIOGRAFÍA 145

INDICE DE TABLAS

Tabla ..... Página

Tabla II.1. Usos de *A. quebracho-blanco* en medicina popular. NE (no especificado en la referencia bibliográfica). 28

Tabla III.1. Localización de los sitios experimentales: Parque Provincial Bajo de Véliz (**BV**), Reserva Natural Provincial Quebracho de la Legua (**QL**), Parque Natural Provincial y Reserva Forestal Natural Chancaní (**C**), San Jerónimo (**SJ**) y Campo Experimental INTA La María-Santiago del Estero (**SG**). 49

Tabla III.2. *Primers* degenerados para *SGD, STR* y *TDC*. 89

Tabla IV.1. Secuencia de los *primers* seleccionados de la Serie A de Operon Technologies (OPA). 93

Tabla IV.2. Valores de similitud genética (superior a la diagonal) y distancia genética (inferior a la diagonal) - Nei (1972), de los 129 ejemplares de *A. quebracho-blanco* pertenecientes a las cinco poblaciones.....99

Tabla IV.3. Valores de distancias entre los puntos del dendrograma y las distintas poblaciones.....99

Tabla IV.4. Descriptores de la estructura genética de *A. quebracho-blanco* en los diferentes sitios de estudio. **N**: total de individuos; **na**: número de alelos observados; **ne**: número efectivo de alelos por locus - Kimura & Crow (1964); **h**: diversidad genética de Nei (1973); **P**: porcentaje de loci polimórficos 102

Tabla IV.5. Diversidad genética de las poblaciones Pop 1-QL, Pop 2-SJ, Pop 3-BV, Pop 4-C y Pop 5-SG estimada mediante índice de Shannon – Weaver. Diversidad intrapoblacional (Ho) por *primer* en particular y con todos los *primers;* la diversidad promedio poblacional (Hpop) y la diversidad estimada para la especie (Hsp). 103

Tabla IV.6. Proporción de diversidad genética intra (Hpop/Hsp) e interpoblacional (Hsp - Hpop)/Hsp, estimada mediante índice de Shannon – Weaver para las cinco poblaciones estudiadas (Pop 1-QL, Pop 2-SJ, Pop 3-BV, Pop 4-C y Pop 5-SG).....103

Tabla IV.7. Valores de AMOVA para los 129 ejemplares estudiados. Donde g.l. son los grados de libertad, SC la suma de cuadrados, % es el porcentaje de variación y Φ es el

estadístico de diferenciación genética. Los valores resultaron estadísticamente significativos con $p < 0,001$. 105

Tabla IV.8. Valores de Ht, Hs, G_{ST} y Nm a nivel de las subregiones SRI (Pop1-QL y Pop2- SJ), SRII (Pop3-BV, Pop4-C y Pop5- SG) y a nivel de poblaciones totales. Entre paréntesis se muestra la desviación estándar.. 106

INDICE DE FIGURAS

Figura ..... **Página**

Figura I.1. Red de áreas prioritarias para la conservación de la biodiversidad. Evaluación Ecorregional de Gran Chaco Americano. 15

Figura II.1. Subregiones del Gran Chaco americano. 19

Figura II.2. *Aspidosperma quebracho-blanco* Schltdl. Detalle de la corteza (A), inflorescencia y hojas (B), fruto (C) y plántula (D). 23

Figura II.3. Crecimiento vegetativo en *A. quebracho-blanco* Schltdl. A. Brotes epirrizos; B. Rebrote en el estado de plántula. 26

Figura II.4. Esquema de la amplificación mediante la técnica RAPD. 32

Figura II.5. Reacciones catalizadas por las enzimas implicadas en la biosíntesis de los alcaloides monoterpén indólicos. Triptófano descarboxilasa (TDC); Estrictosidina sintasa (STR) y Estrictosidina β-D-glucosidasa (SGD). 45

Figura III.1. Localización de los sitios experimentales: Reserva Natural Provincial Quebracho de la Legua (QL), San Jerónimo (SJ), Parque Provincial Bajo de Véliz (BV), Parque Natural Provincial y Reserva Forestal Natural Chancaní (C) y Campo Experimental INTA "La María" - Santiago del Estero (SG). 49

Figura III.2. Localización de la Reserva Natural Provincial Quebracho de la Legua, sobre la RN 20, en el paraje "La Chañarienta", provincia de San Luis. 50

Figura III.3. A. Entrada a la Reserva Natural Provincial Quebracho de la Legua. B. Vista aérea del sitio experimental QL, sobre la RN 20. 51

Figura III.4. Localización del sitio experimental San Jerónimo. 52

Figura III.5. A. Vista aérea del sitio experimental San Jerónimo. B. Ejemplar de *A. quebracho-blanco* en SJ. 53

Figura III.6. A. Localización del Parque Provincial Bajo de Véliz. B. Vista aérea de la profunda depresión perteneciente al sitio experimental BV. 54

Figura III.7. Ejemplar de *A. quebracho-blanco* presente en el sitio experimental BV, con las Sierras de San Luis de fondo. En la fotografía conjunta se observa el arroyo Cautana que surca la depresión del Parque BV. 56

Figura III.8. Vista del miembro Lomas, en la Formación geológica Bajo de Véliz. 57

Figura III.9: A. Localización del Parque Natural y Reserva Forestal Chancaní, Dpto. Pocho, Provincia de Córdoba. B. Vista aérea del sitio experimental C, donde se demarca la superficie protegida. 58

Figura III.10. A. Entrada al Parque Natural Provincial y Reserva Forestal Natural Chancaní. B. Ejemplar de *A. quebracho-blanco* presente en este sitio experimental. C. Vista aérea del sitio experimental C. 59

Figura III.11. A. Vista aérea del Campo Experimental INTA – La María, Prov. de Santiago del Estero. B. Localización del sitio experimental SG. 61

Figura III.12. Parcelas de muestreo en el Campo La María – INTA, Prov. de Santiago del Estero. 62

Figura III.13. Caminos internos y bosque Nativo en el Campo La María – INTA, Prov. de Santiago del Estero. 62

Figura III.14. Vector de clonación pGem-T Easy. 78

Figura III.15. Sitio de clonado múltiple en el vector pGem-T Easy. 83

Figura III.16. Esquema representativo de la obtención de la secuencia completa del inserto a través de secuenciación con *primers* T7 y SP6 en pGem-T Easy. 84

Figura III.17. *RT- PCR.* Transcripción reversa que utiliza como templado el ARNm para dar lugar al ADNc. Amplificación de los genes codificantes para *TDC, STR* y *SGD* mediante *primers* degenerados. 87

Figura IV.1. Patrones de amplificación RAPDs obtenidos con el *primer* OPA 16 en muestras de QL, SJ, BV, C y SG. 95

Figura IV.2. Patrones de amplificación RAPDs obtenidos con el *primer* OPA 11 en muestras de QL, SJ, BV, C y SG. 96

Figura IV.3. Dendrograma de las muestras de Pop 1-QL, Pop 2-SJ, Pop 3-BV, Pop 4-C y Pop 5-SG obtenido mediante análisis de agrupamiento usando UPGMA. 98

Figura IV.4. Dendrograma basado en la distancia genética de Nei (1972). 100

Figura IV.5. Diagrama de dispersión para los 129 ejemplares pertenecientes a las cinco poblaciones estudiadas (Pop 1-QL, Pop 2-SJ, Pop 3-BV, Pop 4-C y Pop 5-SG) según el peso de cada ejemplar sobre la primer y segunda coordenadas. 101

Figura IV.6. Porcentaje de la Varianza Molecular (AMOVA) de las cinco poblaciones en estudio (Pop 1-QL, Pop 2-SJ, Pop 3-BV, Pop 4-C y Pop 5-SG). 104

Figura IV.7. Porcentaje de la Varianza Molecular (AMOVA) en distintos niveles jerárquicos, con las cinco poblaciones agrupadas en 2 regiones: SRI (Pop 1-QL y Pop 2-SJ) y SRII (Pop 3-BV, Pop 4-C y Pop 5-SG). 105

Figura IV.8. Porcentaje de la Varianza Molecular (AMOVA) en cada una de las subregiones: SRI (Pop 1-QL y Pop 2-SJ) y SRII (Pop 3-BV, Pop 4-C y Pop5-SG). 106

Figura IV.9. A. Reamplificación de la banda purificada con los *primers* OPA 7 y OPA 16 que dieron origen a la banda; B. Producto de PCR del inserto con *primers* T7 y SP6 del vector pGem-T Easy; C. digestión del plásmido recombinante con *EcoRI*. 109

Figura IV.10. Solapamiento de secuencias obtenidas con los *primers* T7 y SP6 y secuencia completa del fragmento B1200. 112

Figura IV.11. Solapamiento de secuencias obtenidas con los *primers* T7 y SP6 y secuencia completa del fragmento B600. 113

Figura IV.12. Homología en la secuencia de nucleótidos del marcador B1200 con secuencias de la base de datos (BLASTn). 114

Figura IV.13. Secuencias homólogas de *A. thaliana* al marcador B1200. 115

Figura IV.14. Panel A.-Presencia de dominios conservados REC y HPT en el marcador B1200 donde se observan los sitios de activación, fosforilación, reconocimiento intermolecular y dimerización conservados en la secuencia. Panel B.- Representación esquemática de las proteínas His quinasas híbridas, observándose los dominios conservados. 116

Figura IV.15. Cladograma obtenido tras el alineamiento múltiple de B1200 y sus homólogos en *A. thaliana*..... 117

Figura IV.16. Presencia de dominios conservados Acetiltransferasa en el marcador B600. 118

Figura IV.17. Dendrograma obtenido tras el alineamiento múltiple de B600 y secuencias con dominio acetiltransferasa en *A. thaliana.* 118

Figura IV.18. Amplificación con *primers* específicos para B1200 en las poblaciones estudiadas. 120

Figura IV.19. Amplificación con *primers* específicos para B600 en las poblaciones estudiadas. 121

Figura IV.20. A. Amplificación de B1200 a 49°C sin el agregado extra de $MgCl_2$. **B.** Amplificación de B1200 a 51°C sin el agregado extra de $MgCl_2$. **C.** Amplificación de B1200 a 55°C sin agregado extra de $MgCl_2$ y con el agregado de 0.4 ul y 0.8 ul de $MgCl_2$ 50mM. 122

Figura IV.21. Reamplificación de B1200 donde se utilizó como templado el producto purificado de PCR a 55°C sin el agregado extra de $MgCl_2$. En esta amplificación se realizaron 10 ciclos a 56°C y 20 ciclos a 57°C, en ausencia (-) o en presencia (0.8 ul) de $MgCl_2$ 50 mM adicional. 123

Figura IV.22. ARN de las muestras C7 y C31 de *A. quebracho-blanco*, donde se pueden observar las distintas subunidades del ARNr. 124

Figura IV.23. RT-PCR de GAPDH según protocolo de Plas *et al.* (2002) y Schiene *et al.* (2004). 125

Figura IV.24. RT-PCR de STR según protocolo modificado de Yamazaki

et al. (2003). 126

Figura IV.25. Reamplificación de STR a partir del producto de amplificación en BV7 bajo distintas condiciones de $MgCl_2$, dNTPs y *primers.* 127

Figura IV.26. RT-PCR de SGD según protocolo modificado de Geerlings *et al.* (2000). 128

Figura IV.27: Reamplificación de SGD a partir del producto de amplificación en BV10 bajo distintas condiciones de $MgCl_2$, dNTPs y *primers.* 128

Figura V.1. Localización y valores de precipitación media anual de los sitios experimentales. 130

Figura V.2. Dominios de algunas proteínas pertenecientes al Sistema de dos componentes en *A. thaliana*. 140

Figura V.3. Receptor de Etileno, una Histidina quinasa perteneciente al Sistema de dos componentes tipo híbrido. 140

ABREVIATURAS

ADN	ácido desoxirribonucleico
ADNc	ácido desoxirribonucleico complementario
AMIs	alcaloides monoterpén-indólicos
AMOVA	Análisis de la Varianza Molecular
AP-PCR	*Arbitrarily Primed PCR*
ARN	ácido ribonucleico
ARNm	ácido ribonucleico mensajero
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool - NCBI
BV	Parque Provincial Bajo de Véliz
C	Parque Natural Provincial y Reserva Forestal Natural Chancaní
CAJ	Coeficiente de Asociación de Jaccard
CTAB	bromuro de N-cetil-N, N, N- trimetilamonio
DAF	*DNA amplification fingerprinting*
dNTPs	desoxiribonucleótidos trifosfato
DO	densidad óptica
EDTA	ácido etilendiaminotetracético (*ethylene diamine tetra acetate*)
GAPDH	gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GPS	Sistema de Posicionamiento Global (Global Positioning System)
G_{ST}	Coeficiente de diferenciación génica
h	diversidad genética de Nei (1973)
Ho	diversidad promedio por población y por *primer*
Hpop	diversidad promedio poblacional
Hsp	diversidad de la especie
IPTG	isopropil-β-D-tio-galactósido
INTA	Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria
kDa	kilo Daltons
LB	medio Luria Bertani
m	tasa de migración
MBD	matriz básica de datos
M-MLVRT	*Moloney Murine Leucemia Virus Reverse Transcriptase*
m.s.n.m.	metros sobre el nivel del mar
MW	marcador de peso molecular (*Molecular Weight*)

N	número de individuos analizados
na	número de alelos observados
NCBI	Centro Nacional para la Información en Biotecnología (*National Center of Biotechnology Information)*
ne	el número efectivo de alelos por locus
Nm	flujo génico
O.N.	toda la noche (*overnight*)
P	porcentaje de loci polimórficos
pb	pares de bases
PCR	reacción en cadena de la polimerasa (*Polimerase Chain Reaction*)
pH	potencial hidrógeno
pI	punto isoeléctrico
QL	Reserva Natural Provincial Quebracho de la Legua
RAPDs	Amplificación al Azar de Fragmentos Polimórficos (*Randomly amplified polymorphic DNA*)
RT-PCR	transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa (*Reverse Transcription and Polimerase Chain Reaction*)
SDS	dodecil sulfato de sodio
SG	Campo experimental "La María"
SGD	estrictosidina β-D-glucosidasa
SIGYSA	Servicio Interno de Genotipificación y Secuenciación de ADN - Instituto de Biotecnología, INTA Castelar
SJ	San Jerónimo
STR	estrictosidina sintasa
TAE	Tris/acético/EDTA
TE	Tris/EDTA
TDC	triptófano decarboxilasa
UPGMA	*Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic averages*
UV	ultravioleta
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranósido

RESUMEN

Los bosques de *Aspidosperma quebracho-blanco* Schltdl. en el Chaco Árido constituyen un área prioritaria para la conservación (The Nature Conservancy 2005). Esta región presenta una importante reducción de la superficie de bosque y un acelerado proceso de pérdida de aptitud forestal debido a la sobreexplotación de los recursos y al sobrepastoreo (Montenegro *et al.* 2005). Resulta así de interés estudiar la diversidad genética de las poblaciones de *A. quebracho-blanco*, como también otras variables que puedan contribuir a la resiliencia de esta especie en ambientes naturales.

En el presente trabajo de tesis, se evaluó la distribución de la diversidad genética de la especie mediante el uso de marcadores moleculares RAPDs (Random Amplified Polymorphic DNA) en cuatro áreas protegidas del Chaco Árido y un área no protegida: Reserva Natural Provincial Quebracho de la Legua (QL), Parque Provincial Bajo de Véliz (BV), Parque Natural Provincial y Reserva Forestal Natural Chancaní (C), Campo Experimental INTA La María - Santiago del Estero (SG) y San Jerónimo (SJ). Se evaluaron los siguientes parámetros poblacionales: porcentaje de polimorfismo (P), diversidad genética de Nei (h) y diversidad genética intrapoblacional, estimada con el índice de Shannon-Weaver (Ho). Los mayores valores fueron detectados en: SJ (P = 65,4%; h = 0,214; Ho = 1,95) y QL (P = 65,4%, h = 0,183, Ho = 1,85), poblaciones localizadas en áreas con menor índice de precipitaciones medias anuales.

Un análisis de la partición de la diversidad genética en sus componentes intra e interpoblacional mediante el índice de Shannon-Weaver, evidenció una diversidad genética intrapoblacional del 75% e interpoblacional del 25%. Por otro lado, el análisis de los patrones RAPDs utilizando AMOVA evidenció que el 63% corresponde al componente intrapoblacional y el 37% al componente interpoblacional. La diferenciación genética entre las poblaciones fue de $\Phi = 0,372$ ($p < 0,001$) y la estimación de la diversidad genética de Nei (G_{ST}) obtenida fue de 0,348 para las cinco poblaciones. El flujo génico (Nm= 0,935) entre las poblaciones, indica que menos de un individuo por generación migra. Sin embargo, cuando se analizó el flujo de genes dentro de cada subregión los valores obtenidos (SRI Nm= 1,73 y SRII Nm= 1,35) resultan comparables con aquellos publicados en general para las especies forestales.

El dendrograma obtenido utilizando UPGMA, sugiere que los ejemplares pueden ser agrupados en clusters correlacionados con la distribución geográfica de las poblaciones. El análisis de Coordenadas Principales confirma las asociaciones entre los ejemplares que fueron observadas en el análisis de agrupamiento.

El estudio de la diversidad genética de la especie, se complementa con la secuenciación de dos marcadores RAPDs, identificados como B1200 y B600. El marcador B1200, presentó homología con miembros de la superfamilia del "Sistema de dos componentes" (sistema histidina quinasa, exclusivo de plantas), resultando así de interés para profundizar el conocimiento de mecanismos de transducción de señales en especies forestales. El marcador B600, pese a no poseer homología con secuencias conocidas en plantas, posee un dominio acetil transferasa conservado.

Considerando que *A. quebracho-blanco*, es una especie productora de alcaloides monoindólicos (AMIs), se evaluó la presencia de transcriptos de los genes codificantes de enzimas participantes de las vías biosintéticas de AMIs (metabolismo secundario) mediante RT-PCR, utilizando *primers* degenerados. Las enzimas triptófano decarboxilasa (TDC), estrictosidina sintasa (STR) y estrictosidina β-D-glucosidasa (SGD), las cuales catalizan pasos cruciales de la biosíntesis de AMIs han sido ampliamente estudiadas en otras especies. Si bien los productos de amplificación obtenidos en *A. quebracho-blanco* no resultaron del mismo tamaño que los informados para otras especies, la presencia de bandas definidas sugiere una amplificación específica y por lo tanto la presencia de estas secuencias.

En síntesis, la importancia del presente estudio radica en que los grupos poblacionales estudiados albergan una interesante diversidad genética, información que resulta de gran utilidad para plantear estrategias de conservación de la especie en Chaco Árido, identificando áreas prioritarias para su conservación. Por otra parte, la secuenciación de marcadores RAPDs permitió identificar secuencias correspondientes a genes no descriptos hasta el presente en *A. quebracho-blanco* ni en otras especies forestales.

SUMMARY

The native forests of *Aspidosperma quebracho-blanco* Schltdl. in the Arid Chaco become a prioritary area for conservation (The Nature Conservancy 2005). This region evidences a significant reduction in forest area and an accelerated process of loss of forest aptitude due to overexploitation of resources and overgrazing (Montenegro *et al.* 2005). Thus, it becomes of interest to study the population´s genetic diversity of *A. quebracho-blanco*, as well as other variables that might contribute to resilience of this species in natural environments.

In this work, we evaluated the distribution of genetic diversity of this species by means of RAPDs molecular markers (Random Amplified Polymorphic DNA) in four protected areas of the Arid Chaco and one unprotected area: Reserva Natural Provincial Quebracho de la Legua (QL), Parque Provincial Bajo de Véliz (BV), Parque Natural Provincial y Reserva Forestal Natural Chancaní (C), Campo Experimental INTA La María - Santiago del Estero (SG) y San Jerónimo (SJ). At population level, parameters such as percentage of polymorphism (P), Nei's genetic diversity (h) and genetic diversity estimated with the Shannon -Weaver index (Ho) were analyzed. The highest values were detected in: SJ (P = 65.4 % , h = 0.214 , Ho = 1.95) and QL (P = 65.4 % , h = 0.183 , Ho = 1.85), for populations located in areas of the lowest annual precipitation index.

An analysis of the partition of genetic diversity in their intra- and inter-population components by means of Shannon-Weaver index, evidenced a within populations genetic diversity of 75% and an inter-population component of 25%. Furthermore, the analysis of RAPD patterns using AMOVA showed that 63% corresponds to the intrapopulation component and 37% to the interpopulation component. Genetic differentiation between populations was $\Phi = 0.372$ ($p < 0.001$) and the estimation of genetic diversity of Nei (G_{ST}) obatined was 0.348 for the five populations. Gene flow (Nm = 0.935) among populations, indicates that less than one individual migrates per generation. However, when gene flow was analyzed within each subregion, the obtained values (SRI Nm= 1,73 y SRII Nm= 1,35) were comparable with those published in general for forest species.

The UPGMA dendrogram suggests that individuals may be grouped into clusters correlated with the geographic distribution of populations. Principal Coordinates Analysis confirms these associations.

The study of genetic diversity of *A. quebracho-blanco*, was complemented with sequence analysis of two RAPD markers, identified as B1200 and B600. The B1200 marker showed homology with members of the superfamily of "two-component system" (histidine quinase system, specific for plants), thus resulting of interest for the knowledge of signal transduction mechanisms in forest species. The B600 marker despite having no homology with known sequences in plants, contain a conserved acetyl transferase domain.

Considering that *A. quebracho-blanco*, is a mono indol alkaloid (MIA) producing species, we evaluated the presence of mRNA transcripts of genes coding for enzymes involved in MIAs biosynthetic pathways (secondary metabolism), by using RT-PCR with degenerate primers. The enzymes tryptophan decarboxylase (TDC), strictosidine synthase (STR) and strictosidine β -D- glucosidase (SGD), which catalyze crucial steps in the biosynthesis of MIAs, have been extensively studied in other species. Although RT-PCR products obtained for *A. quebracho-blanco* were not of the same size than those reported for other species, the presence of well-defined bands suggests a specific amplification and therefore the presence of these sequences.

In summary, the importance of the present study was to state that the populations studied contain an interesting genetic diversity, useful information in order to propose conservation strategies for the species in Chaco Arido, thus identifying priority conservation areas. Besides, sequentiation of RAPDs markers allowed us to identify sequences which correspond to genes not described previously in *A. quebracho-blanco* neither in other forest species.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

I.1. FUNDAMENTACIÓN Y RELEVANCIA DEL ESTUDIO

En la actualidad, los bosques del Chaco Seco argentino representan ecosistemas sometidos a rápidos procesos de deforestación y fragmentación, lo cual conlleva a la pérdida de hábitat y, consecuentemente, a la disminución de la biodiversidad, poniendo en riesgo la sustentabilidad del bosque nativo como proveedor de bienes y servicios. Es en esta ecorregión donde, *Aspidosperma quebracho-blanco* Schltdl. es considerada como especie dominante del bosque "clímax", sin embargo, la superficie cubierta por este quebrachal se ha visto reducida a sitios protegidos o poco perturbados (Atlas de los Bosques Nativos Argentinos 2003; Torrella & Adámoli 2005; Britos & Barchuk 2013).

Desde hace más de un siglo, esta región enfrenta la pérdida sostenida de su patrimonio a causa del uso no planificado de los recursos naturales y culturales. La explotación maderera, la ganadería bajo monte sin prácticas de manejo y el reemplazo de bosques por pasturas y cultivos son las principales causas de la pérdida del bosque.

La Argentina ha enfrentado en las últimas tres décadas uno de los procesos de transformación de sus bosques nativos de mayor dimensión, con el agravante de que en la actualidad el reemplazo de los bosques por la agricultura se realiza principalmente por el monocultivo de soja (Zarrilli 2007). Este tipo de práctica agrícola deteriora los recursos de tal manera que dicha transformación es permanente y de tal impacto que si las tierras fueran abandonadas, la recuperación del bosque nativo original no sería factible, generándose en algunos casos un arbustal de escaso valor económico (Montenegro *et al.* 2005). En los últimos veinte años, se perdieron más de dos millones de has. de bosques chaqueños en Argentina, lo que representa aproximadamente el 10% de su superficie.

En el proyecto “Evaluación Ecorregional del Gran Chaco Americano” (The Nature Conservancy 2005), se ha establecido una “red de áreas prioritarias para la conservación de la biodiversidad” (Figura I.1). Pese a su importancia en la estructura y función de los ecosistemas, existe una carencia de estudios sobre las características genéticas de las

especies forestales nativas, en estas áreas prioritarias de conservación, en especial de especies dominantes como *A. quebracho-blanco*.

La fragmentación del bosque conduciría a una pérdida de diversidad genética (Dobrovolski *et al.* 2011). Aldrich & Hamrick (1998) postulan que la reproducción en fragmentos remanentes de bosque, podría generar cuellos de botella genéticos, en tanto que el intercambio de genes entre fragmentos contribuye a mantener la diversidad genética. Según Hamrick (2001), los estudios genéticos moleculares están contribuyendo a una mejor comprensión de los patrones de variación genética como base del desarrollo de prácticas de manejo mejorado, como así también para monitorear el recambio de especies en tiempo y espacio.

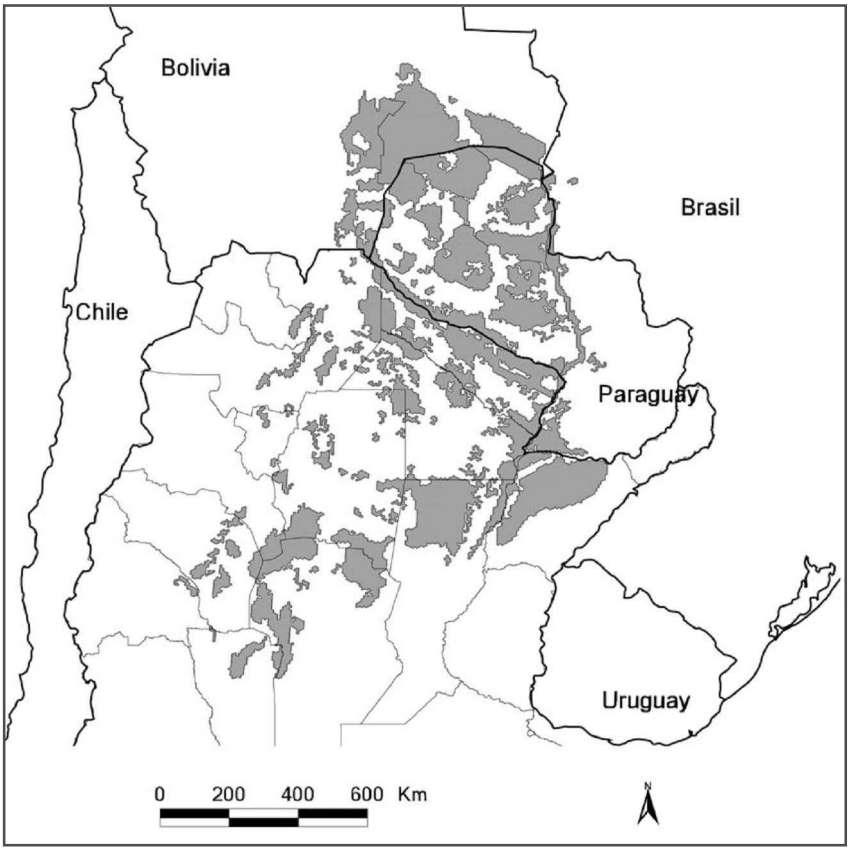


Figura I.1. Red de áreas prioritarias para la conservación de la biodiversidad. Evaluación Ecorregional de Gran Chaco Americano (Fuente: The Nature Conservancy 2005).

Los marcadores RAPDs (*Randomly amplified polymorphic DNA*) son particularmente útiles en estudios orientados a la conservación de especies nativas, ya que presentan ciertas ventajas, como no requerir conocimiento previo del genoma (Mitchelson *et al.* 1999; Das *et al.* 2005), su rapidez y bajo costo (Becerra & Paredes 2000; Kjølner *et al.* 2004; Li & Jin 2006) y requerir una pequeña cantidad de ADN muestra (Rossetto *et al.* 1995; Becerra & Paredes 2000; Escudero *et al.* 2003). La principal ventaja de esta metodología es que provee un gran número de marcadores, permitiendo la resolución de patrones complejos de variación genética (Huff *et al.* 1993; Peakall *et al.* 1995).

Este trabajo de tesis constituye la primera evaluación de la diversidad genética de *A. quebracho-blanco* en el Chaco Seco, subregión Chaco Árido y Chaco Serrano, utilizando marcadores moleculares RAPDs (Capítulo IV – Parte I). Generalmente, las estrategias de conservación son desarrolladas con poca o ninguna referencia a la información genética y molecular de las especies a conservar (Allnut *et al.* 2003). La evaluación de los patrones de diversidad genética en *A. quebracho-blanco* es de particular importancia en el desarrollo de futuras estrategias de conservación del bosque nativo ya que especies de árboles dispersos o de limitada distribución son más vulnerables al cambio climático que especies ampliamente distribuidas. Además, la diversidad genética forestal juega un importante papel en el mantenimiento de la resiliencia del ecosistema y en la adaptación a cambios en las condiciones climáticas (Kramer 2007).

Con el propósito de enriquecer el conocimiento de la estructura genética poblacional de la especie, se caracterizaron algunos marcadores RAPDs generados en el análisis de diversidad genética. La obtención de la secuencia de algunos de los marcadores RAPDs, posee el valor de ser las primeras secuencias que se dispondría de *A. quebracho-blanco* (Capítulo IV – Parte II). En este estudio, por comparación con el banco de genes, se infirió si las secuencias obtenidas corresponden a regiones repetitivas del genoma o regiones codificantes.

Por otra parte, las plantas han desarrollado vías complejas para la biosíntesis de metabolitos secundarios, involucrados en una multitud de funciones ecológicas entre ellas las interacciones planta-microorganismos, planta-insectos, planta-planta e interacciones planta-vertebrados, proporcionando además protección contra condiciones abióticas adversas (Kutchan 1995). *A. quebracho-blanco*, es una especie productora de alcaloides monoterpén-indólicos (AMIs). Si bien se reconoce la existencia de alcaloides procedentes

de esta especie, las enzimas participantes de las vías biosintéticas de alcaloides no han sido aún caracterizadas. Las enzimas triptófano decarboxilasa (TDC), estrictosidina sintasa (STR) y estrictosidina β-D-glucosidasa (SGD) que catalizan pasos cruciales de la biosíntesis de AMIs han sido ampliamente estudiadas en especies productoras de alcaloides modelos como *Catharanthus roseus* y *Rauvolfia serpentina* (De Luca & Cutler 1987; Stevens *et al.* 1993 a). Con el propósito de complementar el estudio de la diversidad genética de la especie a nivel genómico, se determinó por RT-PCR la presencia de transcriptos pertenecientes a algunas enzimas participantes en la biosíntesis de los AMIs (Capítulo IV – Parte III).

I.2. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la diversidad genética de una especie forestal nativa *A. quebracho-blanco* Schltdl. en Chaco Seco, subregión Chaco Árido y Chaco Serrano, con la finalidad de evaluar su potencial de adaptación a cambios ambientales.

CAPÍTULO II

ANTECEDENTES

ANTECEDENTES

II.1. EL GRAN CHACO AMERICANO

El Gran Chaco Americano es la ecorregión boscosa más extensa del continente después del Amazonas y la superficie más grande de bosques secos de América del Sur. Presenta una gran variedad de climas y relieves que dan origen a una amplia diversidad de ambientes; desde pastizales, esteros y sabanas; hasta bañados, salitrales, sierras y ríos; junto a una gran extensión y diversidad de bosques y arbustos. Esta gran cantidad de ambientes se traduce en una alta diversidad de especies animales y vegetales que hacen del Chaco un área clave para la conservación de la biodiversidad. En esta ecorregión, se conocen más de 3400 especies de plantas, alrededor de 500 especies de aves, 150 especies de mamíferos, 120 especies de reptiles y aproximadamente 100 especies de anfibios (The Nature Conservancy 2005).

Se expande sobre una llanura semiárida que abarca el norte de Argentina, sudoeste Paraguay, sudeste de Bolivia y una pequeña parte del sudeste de Brasil (Biani *et al.* 2005; Bonino & Araujo 2005; Naumann 2006). Presenta una superficie de aproximadamente 1.141.000 km^2, de los cuales el 59% se encuentra en Argentina, 23% en Paraguay, 13% en Bolivia y el 5% Brasil (Naumann & Madariaga 2004).

En Argentina se extiende por las provincias de Formosa, Chaco, este de: Salta, Jujuy, Tucumán, Catamarca y La Rioja; Santiago del Estero; norte de: San Luis, Córdoba y Santa Fe y noroeste de Corrientes, con una superficie total de aproximadamente 674.959 km^2. Limita al oeste con la cordillera de los Andes y al este con los ríos Paraná y Paraguay, y comprende ambientes con una amplia gama de precipitaciones (350-1200 mm).

Según el gradiente de aridez, creciente de este a oeste, el Gran Chaco Argentino se divide en las siguientes subregiones (Figura II.1): Chaco Oriental o Chaco Húmedo y el Chaco Occidental o Chaco Seco (Prado 1993 a; Biani *et al.* 2005). Cabrera (1976, 1994) divide la provincia fitogeográfica del Chaco argentino en Chaco Húmedo y Chaco Seco (subregiones Chaco Árido y Chaco Serrano). De acuerdo con Brown *et al.* (2005), el

Chaco argentino se denomina Eco-región Chaqueña y se subdivide en las Ecorregiones: Chaco Seco, subregiones Chaco Árido y Chaco Serrano (Torrella & Adámoli 2005) y Chaco Húmedo (Ginzburg & Adámoli 2005).

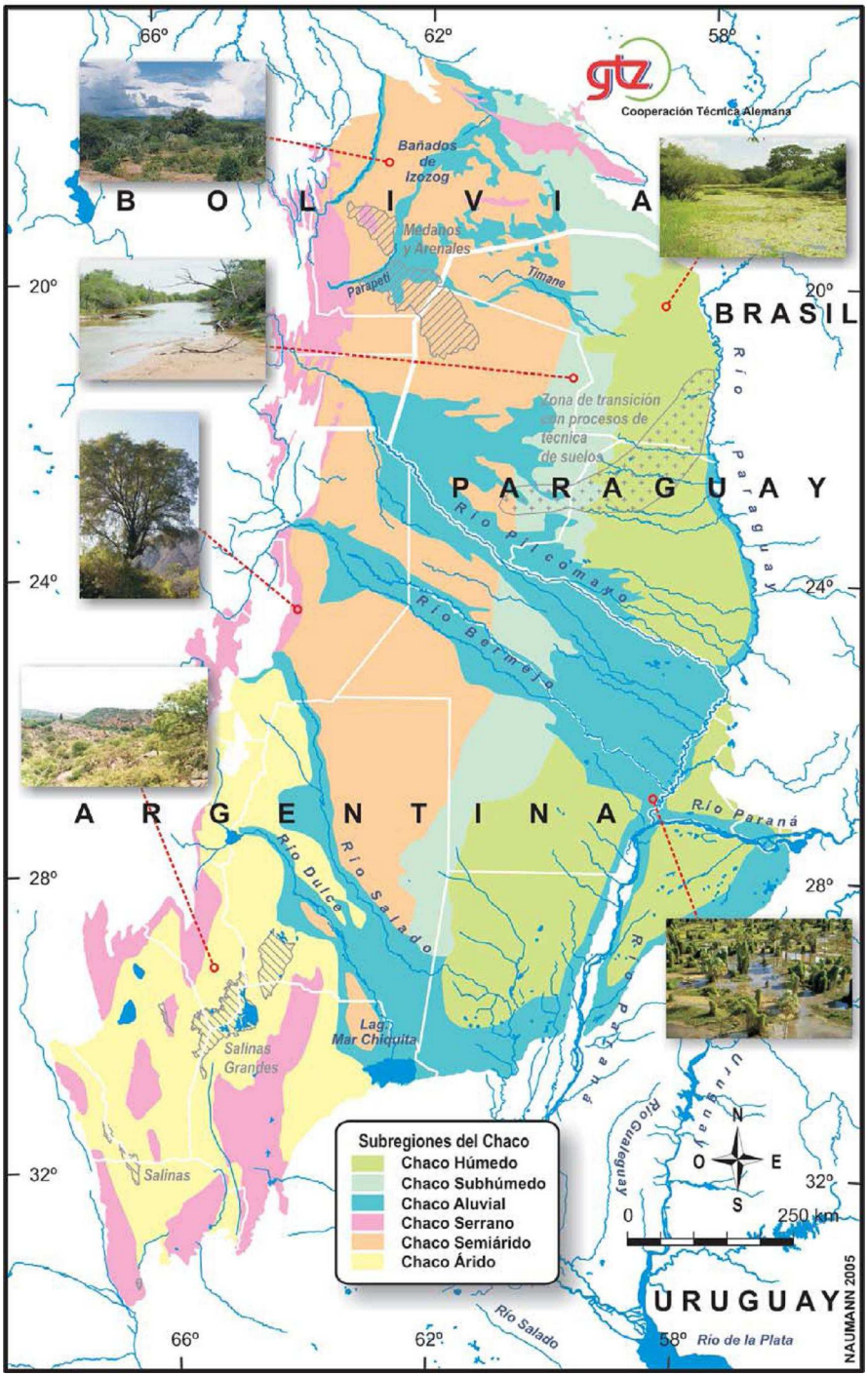


Figura II.1. Subregiones del Gran Chaco americano. Extraída de: Naumann (2006): Atlas del Gran Chaco Sudamericano.

El Chaco Seco ocupa el extremo sudoeste del Gran Chaco Americano y tiene una superficie aproximada de 8 millones de hectáreas, desde los 64 ° 30 ' a 67 º 30' de longitud oeste y desde 28 º 30 ' a 33 º 00 ' de latitud sur (Morello *et al.* 1985). Se trata de una vasta planicie con suave pendiente hacia el este, extendiéndose sobre el sector occidental de Formosa y Chaco, el sector oriental de Salta, casi todo Santiago del Estero, norte de Santa Fe y Córdoba, y sectores de Catamarca, La Rioja y norte de San Luis. La llanura presenta ocasionales interrupciones serranas, localizadas principalmente en el extremo austral.

El clima es continental, cálido subtropical, la temperatura media anual varía de norte a sur desde 23 °C hasta cerca de los 18 °C. Las precipitaciones medias varían entre 100 y 800 mm anuales, son marcadamente estivales, disminuyendo en forma acentuada hacia el sudoeste, en el límite con la eco-región del Monte. En el norte de la eco-región se encuentran suelos más o menos evolucionados, ricos en nutrientes minerales y de textura media fina, mientras que hacia el centro y sudoeste predominan suelos arenosos con bajo contenido de materia orgánica. La salinidad está casi siempre presente a alguna profundidad del suelo y a veces se manifiesta desde la superficie.

El tipo de vegetación característica es el bosque xerófilo, cuyos árboles se vuelven más bajos y ralos hacia el Chaco Árido. También abundan según zonas y subregiones, bosques serranos, sabanas y pastizales. Las zonas más altas, dentro del relieve llano, poseen bosques xerófilos (quebrachales) de *Schinopsis lorentzii* (quebracho colorado santiagueño), *A. quebracho-blanco*, con *Ziziphus mistol* (mistol), *Prosopis kuntzei* (itín), *Ceiba chodatii* (palo borracho), *Cercidium praecox* (brea), acompañados por varias cactáceas y arbustos del género *Acacia* y *Capparis*. En algunas áreas bajas, la salinidad y las restricciones en el drenaje condicionan la composición florística, dando lugar a comunidades de *Bulnesia sarmientoi* (palo santo), algarrobos y *Geoffroea decorticans* (chañar) y, en los salares, a vegetación con predominio de especies halófitas.

El Chaco Serrano se extiende de norte a sur, sobre las Sierras Subandinas y Pampeanas. Ocupa las laderas bajas de cerros y quebradas, formando un amplio ecotono con las Yungas y el Monte y alcanzando unos 1800 m.s.n.m. La vegetación dominante son bosques xerófilos que suelen estar compuestos por *A. quebracho-blanco, Schinopsis haenkeana* (horco-quebracho), *Acacia visco* (visco), *Acacia caven* (espinillo) y *Lithraea molleoides* (molle de beber). Una formación particular de las sierras cordobesas y puntanas son los palmares de *Trithrinax campestris* (palmera caranday). Por encima de estos

bosques dentro del gradiente altitudinal, se encuentran estepas de gramíneas conformando islas biogeográficas con rasgos de la Puna. En estos pastizales de altura aparecen bosquecillos de *Polylepis australis* (tabaquillo).

En cuanto a la fauna del Chaco Seco, los mamíferos más representativos son los desdentados: mulitas y tatúes, entre ellos *Calyptophractus retusus* (pichiciego chaqueño), *Tolypeutes matacus* (mataco bola), *Priodontes maximus* (tatú carreta) y *Mymecophaga tridactyla* (oso hormiguero). También se encuentran carnívoros de gran porte como *Panthera onca* (yaguareté) y *Puma concolor* (puma); herbívoros tales como *Catagonus wagneri* (chancho quilimero), *Tayassu pecarí* (pecarí labiado), *Lagostomus maximus* (vizcacha), *Pediolagus salinicola* (conejo de los palos) y *Lama guanicoe* (guanaco), ya casi extinguido en la región. Los grupos de aves más característicos son las *Cariama cristata* y *Chunga burmeisteri* (chuñas), y *Eudromia elegans* (martineta), entre otros. Entre los reptiles se destacan la *Boa constrictor occidentalis* (boa lampalagua), *Epicrates cenchria* (boa arco iris), *Chelonoidis chilensis* (tortuga terrestre) y *Tupinambis rufescens* (iguana colorada). Existen anfibios típicos de la eco-región como *Leptodactylus laticeps* (rana coralina) y varios asociados a los ecosistemas salinos. La fauna del Chaco Serrano es básicamente la del Chaco Seco, a las cuales se suman algunas especies de aves comunes en la Argentina dentro de los ambiente de las Yungas, como *Pheucticus aureoventris* (rey del bosque) y *Myioborus brunniceps* (arañero corona rojiza).

II.2. GENERALIDADES DE *ASPIDOSPERMA QUEBRACHO-BLANCO* SCHLTD.

II.2.1. Taxonomía

Reino: Plantae
División: Magnoliophyta
Clase: Magnoliopsida
Orden: Gentianales
Familia: *Apocynaceae*
Género: *Aspidosperma*

Especie: *Aspidosperma quebracho-blanco* Schltdl.

Nombre común: quebracho blanco

Sinónimos: *Aspidosperma crotalorum* Speg.,
Aspidosperma quebracho-blanco fo. *malmeana* Markgr.,
Aspidosperma quebracho-blanco fo. *Schlechtendaliana* Markgr.,
Aspidosperma quebracho-blanco fo. *spegazziniana* Markgr.,
Aspidosperma quebracho blanco var. *pendula* Speg.,
Aspidosperma quebrachoideum Rojas Acosta,
Macaglia quebracho (Schl.) Kuntze.

La familia *Apocynaceae* comprende alrededor de 2000 especies, que se distribuyen en regiones tropicales o subtropicales de todo el mundo. Está constituida por unos 200 géneros, 17 de los cuales se encuentran en Argentina (Ezcurra 1999).

El género *Aspidosperma* comprende aproximadamente 80 especies, distribuidas en América tropical y subtropical. En nuestro país están presentes 4 especies *A. polyneuron* Müll. Arg. (palo rosa), *A. quebracho-blanco* Schltdl., *A. australe* Müll. Arg. (guatambú amarillo) y *A. triternatum* (quebrachillo pardo) (Ezcurra 1999).

II.2.2. Descripción

Aspidosperma quebracho-blanco Schltdl. es un árbol perenne, mediano a grande, de 6 a 20 m de altura y alcanza hasta 1 m de diámetro. Presenta tronco recto y robusto, de corteza color castaño grisácea con profundos surcos longitudinales que junto con otras más breves y casi horizontales, configuran unas placas poligonales irregulares que le otorgan una característica particular (Demaio *et al.* 2002).

Sus hojas son simples, persistentes, pequeñas, elípticas o lanceoladas, de bordes lisos, y consistencia coriácea. Se presentan dispuestas en verticilos de tres, con menos frecuencia de dos, opuestas, con el ápice espinescente y base aguda, de 20 a 50 mm de largo por 8-10 mm de ancho (Demaio *et al*. 2002).

Presenta inflorescencias cimosas, axilares y/o terminales. Las flores son hermafroditas, actinomorfas, de color blanco-amarillentas, perfumadas, de alrededor de 10 mm de largo,

brevemente pediceladas (2 a 4 mm). El cáliz campanulado, con cinco sépalos triangular-aovados, de cerca de 1,5 mm de largo. La corola es gamopétala, hipocrateriforme, con tubo de unos 5 mm de largo, algo ensanchado en la parte media, el limbo con cinco lóbulos oblongo–lineales, involutos, tan largo como el tubo. Presenta cinco estambres insertos en la parte superior del tubo corolino mediante filamentos muy breves; dos anteras loculares aovado-lanceoladas, dorsifijas e intorsas. Con ovario súpero, de dos lóculos, pluriovular, ovoideo, de alrededor de 1 mm de alto y un poco menos de diámetro; presentando estilo cilíndrico, de 1 mm de largo y estigma engrosado y algo hundido (Biloni 1990).

El fruto es una cápsula leñosa, ovoidal redondeada o alargada, de 7 a 11 cm de longitud por 4 a 6 cm de ancho y 1 a 2 cm de espesor, de color verde grisácea. En su interior se encuentran las semillas suborbiculares, de diámetro entre 5 y 7 cm, fuertemente comprimidas, presentando un delgado tegumento que se prolonga en forma de ala membranosa (Orfila 1995). En la Figura II.2 se muestran detalles de la corteza, hojas, flores y frutos de *A. quebracho-blanco*.

Figura II.2. *Aspidosperma quebracho-blanco* Schltdl. Detalle de la corteza (A), inflorescencia y hojas (B), fruto (C) y plántula (D).

II.2.3. Distribución y Ecología

Es una especie propia de Argentina, Bolivia, Paraguay y Uruguay. En Argentina es donde alcanza su mayor extensión, abarcando la región del Chaco y parte de la región del Monte y la Mesopotamia (Dimitri *et al.* 1997), desde la frontera norte hasta el nordeste de San Juan, norte de San Luis, Córdoba, Santa Fe, Corrientes y Entre Ríos. Ocupa altitudes que van desde el nivel del mar hasta los 500 m (Ezcurra 1999), y posiblemente sea la especie forestal con mayor rango latitudinal y altitudinal en Sudamérica (Del Castillo *et al.* 1998). Por su amplia área de distribución y sus características, se puede considerar a *A. quebracho-blanco* como una especie sumamente plástica (Tortorelli 1956).

Respecto de la ecología y del manejo de la especie, en bosques naturales existen observaciones que muestran a esta especie como oportunista y capaz de germinar e instalarse luego de un disturbio importante como el fuego (Del Castillo *et al.* 1998). Otros autores consideran que *A. quebracho-blanco* es una especie tardío sucesional que presenta una baja tasa de emergencia y establecimiento anual y que requiere de mecanismos de facilitación para instalarse, entre ellos, de la sombra de plantas nodrizas (Barchuk *et al.* 1998; Barchuk & Díaz 2000; Barchuk *et al.* 2005).

II.2.4. Estrategias de reproducción

II.2.4.1. Reproducción sexual

La floración de *A. quebracho-blanco*, comienza en agosto y se extiende hasta marzo produciéndose entre octubre y diciembre la máxima intensidad de floración, con algunas variaciones según el año climático o la zona donde se encuentre.

La polinización es mediada por insectos a través de un mecanismo de polinización por "engaño" en el cual los insectos pasan de rama en rama engañados por el aroma de las flores (Lin & Bernardello 1999). Según Schiestl (2005), la polinización por "engaño" la realizan algunos insectos sin experiencia, que aún no han "aprendido" a evitar las flores no gratificantes. En *A. quebracho-blanco*, las flores son visitadas por lepidópteros (*Noctuidea*,

Pyraloidea) que suelen visitar algunas flores en una rama y luego vuelan a otro árbol engañadas por el olor de las flores, sin ninguna recompensa (Lin & Bernardello 1999).

La fructificación comienza en setiembre - octubre y continúa hasta abril - mayo. Por lo general, una planta florece dos o tres veces durante la temporada de floración y los frutos son retenidos en el árbol durante más de seis meses. Es por esto, que pueden observarse árboles que presentan simultáneamente frutos maduros, verdes y flores.

El desarrollo del fruto, hasta alcanzar su tamaño definitivo, es lento al igual que el proceso de maduración, que se completa a fines de invierno. Los frutos maduros se mantienen largo tiempo en la planta, e incluso después de producida la dehiscencia (a partir de septiembre), los folículos demoran en desprenderse.

La dispersión de las semillas es anemocórica (Barchuk & Diaz 2000; Barberis *et al.* 2002) y ocurre desde fines de septiembre hasta marzo, con un pico máximo entre noviembre y febrero. La viabilidad de la semilla es muy breve una vez derramada del fruto (Del Castillo *et al.* 1998). Existe cierta falta de conocimiento acerca de los requerimientos de luz, humedad y temperatura óptimos para la germinación de semillas de *A. quebracho-blanco*. Sin embargo en un estudio realizado por Alzugaray *et al.* (2006), estos autores describen a las semillas de *A. quebracho-blanco* como ortodoxas, es decir, que toleran una disminución de la humedad por debajo de un 25 % (Willan 1991; Salisbury & Ross 2000), donde su maduración finaliza en la época más fresca y seca del año y sus características morfológicas de bajo peso y cubierta seminal delgada concuerdan con esta clasificación. Se destaca además que en esta especie, el tamaño del embrión está directamente relacionado con la capacidad de germinar. Del Castillo *et al.* (1998) postulan que un mayor porcentaje de germinaciones se produce luego de cada lluvia, sobre todo en sitios sin cobertura herbácea, donde la humedad rompe la membrana externa, y pone a las semillas en contacto con el suelo facilitando su adherencia y germinación. Por otro lado, estudios más recientes (Talamo *et al.* 2012) demuestran que el ancho y el largo del fruto se relacionan positivamente con el número de semillas fértiles por fruto.

La oferta sucesiva de semillas resulta en *A. quebracho-blanco*, una estrategia adaptativa, y es en este sentido, por el cual se la denomina una especie oportunista (Del Castillo *et al.* 1998). Según estos autores, esta dispersión sucesiva de semillas, permite una mayor coincidencia con condiciones climáticas apropiadas para la germinación. Esta

estrategia explicaría la gran dispersión de esta especie y su adaptación en regiones con distintos niveles de precipitación.

II.2.4.2. Reproducción vegetativa

Al igual que la mayoría de las especies leñosas del Chaco Árido, *A. quebracho-blanco* presenta reproducción del tipo vegetativa (Figura II.3). Esta especie desarrolla brotes epirrizos, que le permiten persistir como adulto, rebrotando ante perturbaciones como la tala, el pastoreo y el fuego (Barchuk *et al.* 2006).

Esta especie presenta también la estrategia de rebrote en el estado de plántula, el estado más vulnerable. Este rebrote ocurre desde yemas adventicias formadas en el hipocótilo y el cuello de la raíz, luego de una perturbación severa (Barchuk *et al.* 2006). Según estos autores, el rebrote favorecería el auto-reemplazo de la especie, ya que confiere persistencia *in situ* de los juveniles, retrasando la muerte del individuo.

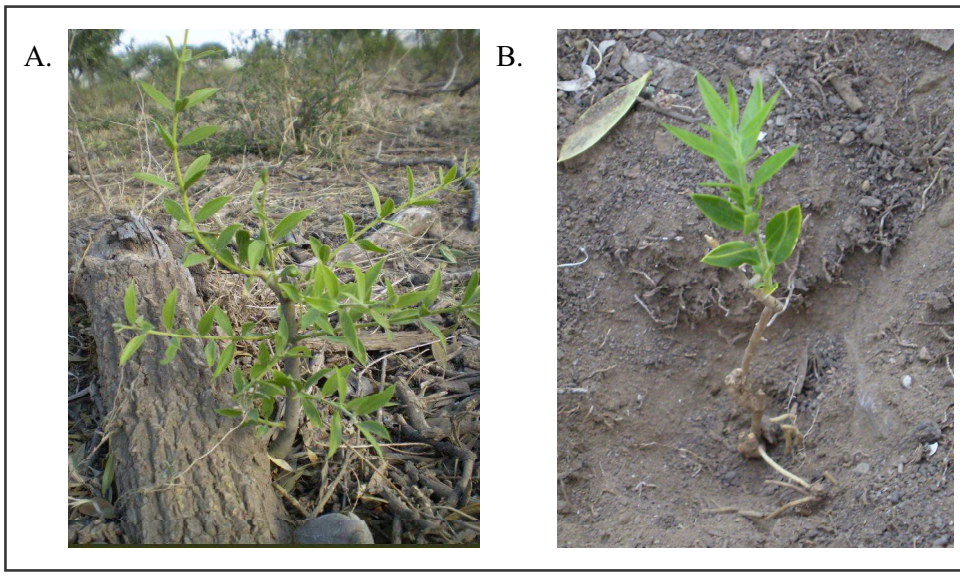


Figura II.3. Crecimiento vegetativo en *A. quebracho-blanco* Schltdl. A. Brotes epirrizos; B. Rebrote en el estado de plántula.

II.2.5. Usos madereros y medicinales

La madera de *A. quebracho-blanco* es fuerte y pesada (800 - 850 kg/m^3). La albura y el duramen son de color amarillo-ocráceo, volviéndose algo rosados en contacto con el aire. El veteado es suave y de textura fina. Impregnada con creosota se la utiliza en la fabricación de durmientes de ferrocarril, horcones y puertas, para confección de artículos de torneado, morteros, etc. Existe también una sobreexplotación de la especie para utilizarla como leña (poder calorífico de 7.300 kcal/kg), postes y carbón, ya que se quema lentamente y produce poca ceniza.

Por otra parte, *A. quebracho-blanco* es una especie muy conocida por sus propiedades medicinales, incluso desde la época precolombina. Luego, los jesuitas que formaron parte de las primeras expediciones por tierras sudamericanas, utilizaron la decocción de la corteza para bajar la fiebre, siendo probablemente los nativos quienes les transmitieron este conocimiento (Varas Fernández 1885).

En la segunda mitad del siglo XIX se estudió científicamente a esta especie por su efectividad en el tratamiento contra el paludismo y en 1882 Hesse, un químico europeo, separó los seis alcaloides que son los principios activos responsables de las propiedades médicas de *A. quebracho-blanco*. En la corteza y en menor medida en las hojas se aislaron 6 alcaloides denominados: aspidospermina ($C_{22}H_{30}N_2O_2$), quebrachamina, hipoquebrachina ($C_{21}H_{26}N_2O_2$), aspidodosamina ($C_{21}H_{26}N_2O_2$), aspidospermatina ($C_{22}H_{28}N_2O_2$) y la quebrachina, esta última idéntica a la yohimbina. Por otro lado, Pereira *et al.* (2007) en una amplia revisión de los tipos de alcaloides presentes en el género *Aspidosperma*, enumera los tipos de alcaloides presentes en *A. quebracho-blanco*, entre ellos los del tipo: pirifolidina, aspidospermina, aspidoscarpina, aspidoalbina, acuamicina, aspidospermatina, quebrachamina, yohimbano, eburnamenina, normacusina, aspidoquibina y otros como razinilam. Actualmente, Rossi *et al.* (2007), han demostrado la presencia de esteroides, taninos, alcaloides y saponinas en hojas y pecíolos de esta especie nativa.

En la Tabla II.1 se detallan los usos en medicina popular, el órgano de la planta utilizado y la forma de preparación del mismo. En la bibliografía citada en dicha tabla, se destaca la utilización de extractos orgánicos, infusiones o decocciones de diferentes partes aéreas de *A. quebracho-blanco* (mayormente corteza y hojas).

Tabla II.1. Usos de *A. quebracho-blanco* en medicina popular. NE (no especificado en la referencia bibliográfica).

Uso medicinal	Forma y órgano empleados	Referencia
Abortivo	Té de corteza y ramitas	Scarpa (2004 a); Carrizo *et al.* (2005); Pensiero *et al.* (2005)
Analgésico	Té de corteza	Filipov 1994; Rondina *et al.* (2008)
Antiasmático	Té de corteza y ramitas	Del Vitto *et al.* (1997); Carrizo *et al.* (2005); Goleniowski *et al.* (2006); Borneo *et al.* (2009)
Anticonceptivo	Hojas	Arias Toledo *et al.* (2010); Trillo *et al.* (2010); Kumar *et al.* (2012); Pensiero *et al.* (2005)
Antidisentérico	Decocción de corteza y hojas	Bourdy *et al.* (2004)
Antidisneico	Corteza	Del Vitto *et al.* (1997); Goleniowski *et al.* (2006); Borneo *et al.* (2009);
Antioxidante	Extracto acuoso	Borneo *et al.* (2009)
Antitumoral?	Extracto orgánico (diclorometano)	Bongiovanni *et al.* (2006)
Antitusivo	Decocción de corteza	Scarpa (2004 a)
Antiviral	Extracto clorofórmico	Konigheim *et al.* (2009)
Apendicitis	Decocción de la corteza	Bourdy *et al.* (2004);
Cicatrizante	Decocción de la corteza	Del Vitto *et al.* (1997); Goleniowski *et al.* (2006); Borneo *et al.* (2009); Pensiero *et al.* (2005)
Contr a el bocio	Semillas atadas en la parte superior del cuello.	Scarpa (2004 a)
Contra la malaria	Té de corteza	Bourdy *et al.* (2004); Scarpa (2004 a)
"Depurar la sangre"	Decocción de corteza	Scarpa (2004 a)
Desinfectante	Hojas	Bandoni *et al.* (1999); Arias Toledo *et al.* (2010); Pensiero *et al.* (2005); Trillo *et al.* (2010); Svetaz *et al.* (2010);
Digestivo	Hojas	Trillo *et al.* (2010)
Disfunción eréctil	Extracto de corteza	Sperling *et al.* (2002); Campos *et al.* (2006)
Dolor de estómago	Té de corteza	Scarpa (2002); Filipov 1994; Scarpa (2004 a); Rondina *et al.* (2008);
Febrífugo	Decocción de corteza	Del Vitto *et al.* (1997); Goleniowski *et al.* (2006); Borneo *et al.* (2009); Pensiero *et al.* (2005)
Laxativo y expectorante	Decocción de corteza	Scarpa (2002); Scarpa (2004 a)
Nacimiento en partos difíciles	Baños de asiento de decocción de corteza	Pensiero *et al.* (2005);
Pediculosis	Lavajes y baños de hojas	Carrizo *et al.* (2005); Arias Toledo *et al.* (2010)
Pesticida (larvicida)	Extracto acuoso	Konigheim *et al.* (2009)
Probl. cardíacos	Té de corteza y ramitas	Carrizo *et al.* (2005)
Sarna	Té y baños de corteza	Martínez & Barboza (2010)
Seborrea/caspa	Lavajes y baños de hojas; decocción de corteza	Scarpa (2004 a); Carrizo *et al.* (2005);
Trastornos hepáticos y bajar el colesterol	NE	Arias Toledo *et al.* (2010);

II.3. CONSERVACIÓN DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA DE BOSQUES NATIVOS

La conservación de los recursos genéticos forestales nativos promueve el mantenimiento de la variación genética contenida dentro y entre especies forestales nativas. En este sentido, el elemento principal en la conservación, es la diversidad genética intraespecífica poblacional ya que desempeña un papel fundamental en la aptitud de las poblaciones para responder a los cambios ambientales. Ciertas poblaciones individuales pueden ser la fuente de adaptaciones específicas como la resistencia a enfermedades o insectos, la tolerancia a ciertas condiciones del suelo u otros atributos que pueden ser de valor actual y futuro.

La falta de información básica sobre la diversidad genética intraespecífica y sobre los procesos que afectan a la diversidad genética, limitan el desarrollo de estrategias científicamente sólidas y eficaces, para la conservación y utilización de los recursos genéticos forestales. Una limitación importante es la falta de conocimiento sobre los niveles y estructura de la diversidad genética de la mayoría de las especies arbóreas forestales nativas así como de su distribución y situación demográfica. De igual manera, faltan con frecuencia, conocimientos sobre la biología reproductiva de estas especies.

Según Frankham *et al.* (2009) la conservación genética es la aplicación de la genética teórica y técnica para reducir el riesgo de extinción en las especies amenazadas, con el fin último de preservar las especies como entidades dinámicas capaces de hacer frente a los cambios ambientales. Sin embargo, desde una perspectiva metodológica, es la población, más que la especie, la unidad funcional evolutiva y ecológica donde deberían concentrarse los esfuerzos multidisciplinarios para la conservación genética porque es en la población donde se producen los cambios genéticos y demográficos fundamentales que determinarán la viabilidad y, por ende, la capacidad adaptativa de las distintas especies (Schemske *et al.* 1994; Sosa *et al.* 2002). Además, el nivel de variación genética en una población juega un papel fundamental en el ecosistema, por la relación que existe entre las especies (Frankham *et al.* 2009).

Las aplicaciones más importantes de la genética de la conservación derivan de la capacidad de aportar una imagen más precisa de los patrones y procesos de las especies en

peligro de extinción. Particularmente, los niveles de variación genética y el flujo génico en poblaciones naturales aportan importantes herramientas para determinar cómo las poblaciones están siendo afectadas (De Salle & Amato 2004). Sin embargo, los aportes para la conservación de las especies forestales nativas, no deben limitarse al conocimiento de la diversidad genética existente en las poblaciones naturales, sino que también deben asociarse a información de la demografía poblacional y de biología reproductiva con el fin de poder ampliar el campo de visión sobre la situación específica de cada especie. De esta manera se garantiza que la toma de decisiones y la planificación de estrategias de manejo en las especies vulnerables estén respaldadas de información fehaciente y actualizada (Bañares *et al.* 2002).

En las últimas dos décadas la conservación genética ha progresado considerablemente de ser un campo meramente teórico en la biología de las poblaciones, a convertirse en una disciplina empírica completamente desarrollada y esto ha sido gracias a los avances en genética molecular que han permitido el uso de marcadores moleculares neutrales en la biología de la conservación (Ouborg *et al.* 2010). Las emergentes técnicas moleculares hacen que hoy sea posible el estudio de las diferencias en la secuencia del ADN en sí, en cualquier especie (Allendorf & Luikart 2007). Los marcadores moleculares han sido utilizados para una variedad de aplicaciones que incluyen el análisis de las relaciones genéticas entre individuos, la construcción de mapas de linaje, la selección asistida, la genética de poblaciones y los estudios filogenéticos (Kalia *et al.* 2011); de hecho su uso se ha extendido tan ampliamente a aspectos de conservación de especies amenazadas que algunos autores consideran que nos estamos acercando a la era de la conservación genómica (Allendorf *et al.* 2010; Ouborg *et al.* 2010).

La elección del marcador molecular depende, en general, de la existencia de información previa de secuencias específicas del genoma en estudio, del resultado que se pretende obtener y de los costos de la técnica elegida. En el caso de especies de genoma no conocido, como *A. quebracho-blanco*, los marcadores basados en secuencias aleatorias, como los marcadores RAPDs son particularmente útiles en la cuantificación de la diversidad genética.

II.4. AMPLIFICACIÓN AL AZAR DE FRAGMENTOS POLIMÓRFICOS DE ADN (RAPD)

La Amplificación al Azar de Fragmentos Polimórficos de ADN conocida por su acrónimo en inglés RAPD (*Randomly Amplified Polymorphic DNA*) fue propuesta inicialmente por Williams *et al*. en 1990 para utilizarla en el mapeo del genoma de organismos vegetales. Welsh & McClelland (1990) desarrollaron, al mismo tiempo, esta metodología para aplicaciones de fingerprinting denominándolos AP-PCR (*Arbitrarily Primed PCR*). Finalmente Caetano-Anolles *et al*. (1991a) los nombraron DAF (*DNA amplification fingerprinting*). Las diferencias en la denominación de estos marcadores dependen de las condiciones específicas de la reacción de amplificación o de la separación y detección de los productos amplificados.

La técnica de RAPDs está basada en la Reacción en Cadena de la Polimerasa, introduciéndose en ella ciertas modificaciones a la PCR convencional. Como lo indica su nombre, los marcadores moleculares RAPDs son obtenidos tras la amplificación por PCR de segmentos al azar del ADN, utilizando *primers* de secuencia arbitraria.

La detección del polimorfismo consiste en permitir la hibridación al azar de un único *primer* que contiene una secuencia arbitraria de 6 a 10 nucleótidos, con un contenido de al menos un 50 % de GC y sin secuencias palindrómicas (Williams *et al.* 1993). Si el *primer* hibrida en cadenas opuestas del DNA y a distancias menores a 3000 pares de bases, se producirá la amplificación de la zona del genoma involucrada entre los dos sitios de hibridación (Figura II.4). Los productos de amplificación generados de esta manera, se observan mediante electroforesis en geles de agarosa.

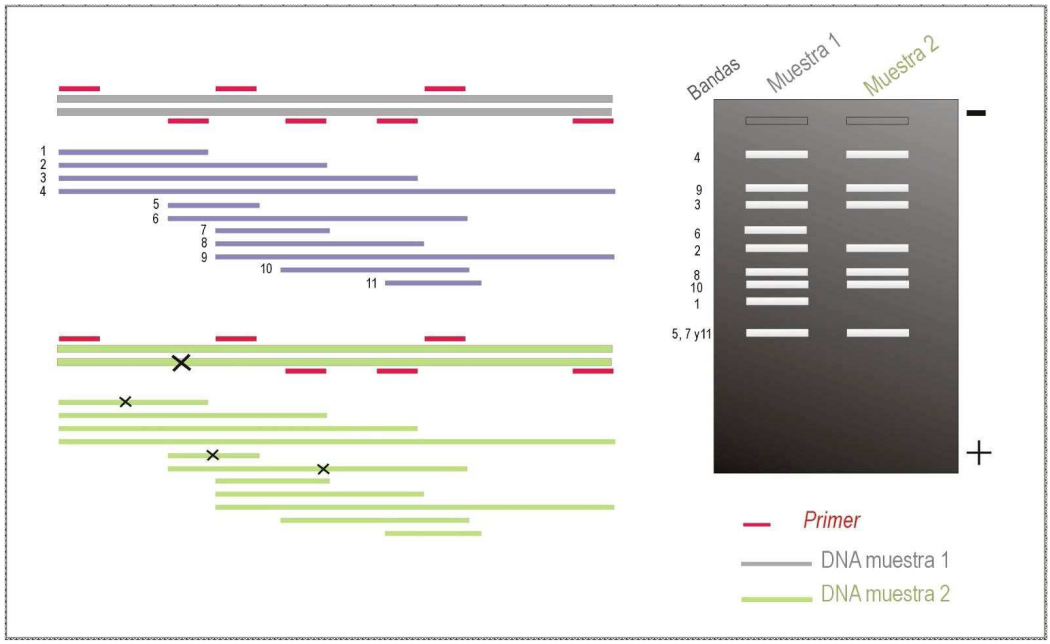


Figura II.4. Esquema de la amplificación mediante la técnica RAPD. Los *primers* (rectángulos rojos) deben hibridar en la orientación y distancia adecuada para que sea posible la formación de productos de amplificación. En el caso del ADN muestra 2, que presenta alterados algunos de los sitios de hibridación del *primer*, puede observarse el patrón diferencial de bandas RAPDs.

El polimorfismo en la técnica RAPD está dado por la presencia o ausencia de bandas de amplificación, donde cada banda es analizada como un locus independiente. Las causas por las que se puede generar un polimorfismo son:

a) mutaciones puntuales o deleciones que no permiten la hibridación del *primer*;

b) rearreglos cromosómicos que cambian la orientación de los *primers* o aumentan la distancia entre los sitios de hibridación más allá del límite de amplificación de la PCR (3000 pb);

c) cambios en el tamaño de los fragmentos amplificados debidos a pequeñas inserciones o deleciones.

Esta técnica analiza varios loci a la vez distribuidos por todo el genoma y es independiente de la complejidad del mismo, presentando generalmente buen nivel de polimorfismo. Esto permite su utilización en estudios de mapeo y fingerprinting de genotipos.

Cuenta con una serie de ventajas adicionales:

a) no se requiere información previa sobre las secuencias del ADN a estudiar ni sobre las secuencias de los *primers;*

b) se necesita poca cantidad de ADN para las reacciones;

c) no se necesita utilizar compuestos radioactivos y requiere poco equipamiento.

Entre las limitaciones de estos marcadores se cuentan: a) son de herencia dominante (por lo que no se pueden distinguir tipos alélicos); b) en muchos casos es discutible la reproducibilidad de los patrones de bandas en experimentos independientes; c) generalmente no son apropiados para detectar diferencias entre genomas originadas en mutaciones simples o deleciones muy pequeñas.

Si bien la reproducibilidad de los patrones de bandas en ensayos entre laboratorios es discutible, la técnica permite obtener excelentes resultados intra laboratorio. Es importante controlar adecuadamente todos los parámetros, en particular las concentraciones de ADN, $MgCl_2$ y *primers*, las condiciones del programa de ciclado, el tipo y cantidad de ADN polimerasa termoestable utilizada, a fin de obtener resultados reproducibles (Yu & Pauls 1992; Meunier & Grimot 1993; Penner *et al.* 1993; He *et al.* 1994).

La concentración y la pureza del ADN a utilizar es una de las variables más importantes a tener en cuenta. Para maximizar la reproducibilidad de esta técnica es importante utilizar métodos de extracción que resulten en ADN puro y no degradado. Respecto a la concentración de ADN muestra a utilizar, una elevada concentración da como resultado bandas RAPDs no definidas, en tanto que una escasa concentración da lugar a patrones irreproducibles (Williams *et al*. 1993).

Disponer de un ADN de buena calidad no es imprescindible para generar un patrón RAPD, pero si para que éste sea reproducible. Un ajuste previo de la concentración óptima producirá también mejores patrones de bandas. Para comparar patrones obtenidos en distintas muestras es conveniente que hayan sido extraídas con el mismo sistema.

La especificidad de la técnica de RAPD depende, fundamentalmente, de la temperatura de 'annealing' o de hibridación de los *primers* y de la cantidad de iones divalentes que se incorporan a la reacción. Por una parte, cuanto mayor sea la temperatura utilizada en la etapa de 'annealing', más específica es la reacción. Esto se debe a que, a mayor temperatura, se dificulta la unión entre el *primer* y la cadena de ADN molde; en

condiciones de temperaturas de 'annealing' elevadas el *primer* sólo se unirá a la cadena molde si son complementarios en todos sus nucleótidos. Por otra parte, en un determinado rango, incrementos en la concentración de $MgCl_2$ hacen disminuir la especificidad de la reacción; los iones facilitan la unión del *primer* a la cadena molde y permiten la incorporación de los nucleótidos a la cadena creciente. De este modo, si se aumenta la temperatura de 'annealing' los patrones tienden a simplificarse, aumentando la astringencia (especificidad) de la amplificación, y desapareciendo entonces las bandas de baja intensidad (Caetano-Anolles & Bassam 1993).

Puesto que durante la reacción PCR se utilizan temperaturas de 'annealing' de los *primers* bajas, las reacciones suelen ser bastante sensibles a la concentración del *primer*. Concentraciones de *primers* diferentes pueden resultar en la generación de patrones de bandas diferentes. Normalmente un exceso de *primer* puede resultar en la amplificación de bandas de bajo peso molecular, mientras que concentraciones bajas pueden resultar en patrones de bandas compuestos preferentemente por bandas de alto peso molecular.

Además los patrones de amplificación son diferentes, cuando se utilizan diferentes ADN polimerasas (Schierwater & Ender 1993).

II.4.1. Repetitividad de los patrones RAPDs

Según algunos autores, una de las desventajas de la utilización de la técnica de RAPD es la poca repetitividad de los resultados de la amplificación (Beebe *et al.* 1995). Aunque otros, como Ellsworth *et al.* (1993), recomiendan estandarizar las condiciones de la reacción e introducir controles internos para evitar los problemas de repetitividad de los experimentos. Algunos autores, para mitigar este problema, eliminan las bandas que no amplifican consistentemente (Yang & Quiros 1993; Novy *et al.* 1994).

La amplificación mediante RAPD depende de muchos factores como se comentó anteriormente, y se ve influenciada por cambios en la concentración del ión Mg^{2+}, la polimerasa utilizada, la temperatura de 'annealing' del *primer* e incluso el termociclador empleado. Todos estos parámetros tienen que ser controlados estrictamente a fin de obtener resultados reproducibles (Yu & Pauls 1992; Meunier & Grimot 1993; Penner *et al.* 1993; He *et al.* 1994; Bielawki *et al.* 1995; Alonso 1999).

II.5. GENÉTICA POBLACIONAL

La genética de poblaciones ofrece muchas herramientas básicas para la biología de la conservación no sólo porque involucra el estudio del origen, cantidad y distribución de la variación genética en las poblaciones, sino porque también involucra el destino de esta variación a través del tiempo y el espacio.

Según Hartl & Clark (1997), en genética de poblaciones el término "población" se refiere a un grupo de organismos de la misma especie que viven en un área geográfica suficientemente restringida para que cada miembro tenga la oportunidad potencial de aparearse con algún otro miembro. No obstante, la definición precisa de esta unidad es difícil y varía de especie en especie debido a la presencia casi universal de algún tipo de estructuración geográfica en las poblaciones. Debido a que muchos fenómenos importantes surgen de las interpretaciones de dos o más factores dentro de una población, la genética de poblaciones incluye el estudio de varias fuerzas que dan como resultado los cambios evolutivos en las especies a través del tiempo. Como consecuencia, la evolución debe ser vista con una perspectiva multidimensional y no basta con examinar cada fuerza evolutiva individualmente (Templeton 2006). Uno de los aspectos principales en genética de poblaciones es, precisamente, descubrir la arquitectura genética de las poblaciones naturales e identificar las fuerzas y factores evolutivos que expliquen dicha variación.

A continuación, se tratarán conceptos básicos a tener en cuenta en el análisis de la estructura genética poblacional de cualquier especie.

II.5.1. Equilibrio de Hardy-Weinberg

El principio de Hardy-Weinberg debe su nombre al matemático inglés Godfrey Harold Hardy y al físico alemán Wilhelm Weinberg que establecieron el teorema independientemente en 1908. Este principio establece que en una población donde el cruzamiento es aleatorio, la composición genética permanece en equilibrio mientras no se presenten mutaciones, migraciones o selección natural. El equilibrio Hardy-Weinberg es simple y sin embargo fundamental para la conservación y la genética evolutiva (Frankham *et al.* 2009).

La utilidad práctica de este teorema reside en que podemos evaluar la magnitud del cambio evolutivo en las poblaciones analizadas comparando las frecuencias genotípicas en las poblaciones naturales, con las que esperaríamos encontrar según el equilibrio Hardy-Weinberg. El teorema cumple la función de hipótesis nula y la genética de poblaciones consiste en gran medida en investigar qué factores provocan la desviación significativa de esta hipótesis nula en las poblaciones naturales.

II.5.2. Estructura genética poblacional

Se entiende por estructura genética de una especie a la cantidad y distribución de la variación genética dentro y entre poblaciones de dicha especie. La estructura genética intrapoblacional consiste en los diferentes tipos de alelos y sus frecuencias en dicha población. Existe una estructuración genética dentro de una población cuando las frecuencias alélicas no se distribuyen al azar, es decir, cuando siguen un determinado patrón o arquitectura que bien puede ser espacial o temporal. Por su parte, la estructura genética interpoblacional es el resultado de la distribución geográfica y en el espacio de subpoblaciones entre las cuales existen diferencias genéticas (Sosa *et al.* 2002; Frankham *et al.* 2009). La partición del total de la diversidad genética de una especie en sus componentes intra e interpoblacional nos permite principalmente, conocer su organización en el espacio (Sosa *et al.* 2002; Allendorf *et al.* 2010).

La estructura genética de una población concreta viene determinada por la historia evolutiva de esa población y va a ser consecuencia de las interacciones entre los factores que condicionan la evolución de las poblaciones: mutación, deriva genética, flujo génico, sistema de reproducción y selección.

- La *mutación* es la fuente fundamental de variación genética ya que conduce a cambios directos en la secuencia del ADN y a la creación de nuevos alelos en las poblaciones. Las poblaciones con más alelos tienen mayor diversidad génica.

- En el proceso de *deriva génica*, los alelos presentes en un momento dado en una población de individuos diploides son sólo una muestra de los alelos presentes en la generación previa, ya que algunos de ellos no fueron transmitidos a la siguiente generación únicamente por azar, y así sucesivamente hacia el pasado (Futuyma 1986). Con el paso del

tiempo, las siguientes generaciones presentarían cada vez menos copias de los alelos originales y cada vez los individuos se volverían más homocigotos, aumentando también la probabilidad de que sus alelos sean idénticos por descendencia. En este proceso gobernado por el azar, la pérdida de heterocigocis va también acompañada de cambios en las frecuencias alélicas, ya que un alelo que por azar deje más descendencia aumentaría su frecuencia en la población. El *tamaño efectivo poblacional* es el tamaño de una población ideal (compuesta por individuos diploides, hermafroditas y autocompatibles) que experimenta la misma tasa de decaimiento de la heterocigosis por efecto de la deriva génica, que la población real bajo estudio. Este concepto fue mencionado por primera vez por S. Wright en su trabajo sobre deriva génica, en el que considera a éste como el factor determinante de la tasa de decaimiento de la heterocigosis: el número de heterocigotos en una población disminuirá a una tasa de 1/(2N), donde N es el tamaño poblacional (Wright 1931).

- El *flujo génico* (Nm) es el proceso mediante el cual determinados alelos son intercambiados entre poblaciones separadas geográficamente. Es un importante componente de la estructura poblacional, ya que sus patrones y niveles determinan hasta qué grado cada población de una especie es una unidad evolutiva independiente (Slatkin 1994). Las poblaciones raramente son sistemas cerrados, por lo general, se produce cierta cantidad de transferencia de genes, lo cual es más probable cuando las poblaciones se hallan estrechamente relacionadas espacial y genéticamente. Entre las poblaciones adyacentes, el flujo de genes puede ser grande, por lo que es de esperar que las poblaciones contiguas posean una composición génica más semejante que las que están más alejadas geográficamente. Al estimar el flujo génico en distintas especies se ha observado que los niveles pueden ser bastante altos (Riesberg & Burke 2001) y que pueden actuar como una fuerza que mantiene la cohesión entre las poblaciones de una especie.

Uno de los problemas en el análisis de la estructura de las poblaciones es determinar la cantidad de flujo génico. Si existe una gran cantidad de flujo génico entre poblaciones locales, entonces todas las poblaciones evolucionan juntas; pero si hay poco flujo génico cada población evoluciona en forma casi independiente. Una medida que resulta fácil de calcular es la multiplicación del tamaño efectivo *(Ne)* por la tasa de migración (*m*), y nos habla del número de "migrantes efectivos" (*Nm*). Si *Nm* es mayor que 1, teóricamente el flujo génico supera los efectos de la deriva génica y previene la diferenciación local. Si *Nm*

es menor que 1 entonces se puede decir que la deriva actúa independientemente en cada una de las poblaciones, y si es mayor de 4 entonces las poblaciones se comportan como una gran población más o menos panmíctica (Piñero *et al.* 2008). Cuánto flujo génico se requiere para impedir la evolución independiente en poblaciones locales diferentes depende de qué otras fuerzas se encuentren actuando. El resultado de Wright para el modelo de la isla (Wright 1931) nos habla del equilibrio alcanzado entre el flujo génico y la deriva genética.

- Además, y muy importante es el hecho de que el *sistema de reproducción* afecta la manera en que la diversidad genética es distribuída dentro y entre poblaciones. Durante la reproducción sexual se generan nuevas combinaciones de alelos (genotipos); en tanto que en la reproducción asexual los genotipos más aptos se mantienen a través de una reproducción clonal e incluso pueden aumentar su frecuencia.

- Finalmente, el papel de la *selección* radica en que los distintos individuos de una población difieren en viabilidad y/o fecundidad y, por lo tanto, contribuyen con número diferente de descendientes (y por tanto de genes) a la siguiente generación. La selección natural es la explicación más plausible para muchos caracteres adaptativos de los organismos. El principal supuesto inherente a la teoría de la selección natural es que algunos tipos hereditarios de una población tienen una cierta ventaja sobre otros para adaptarse, por su mayor supervivencia y/o capacidad reproductora, a los cambios ambientales. La consecuencia principal de la selección es el cambio de las frecuencias génicas, pudiendo admitirse que en grandes poblaciones la selección es probablemente la fuerza más importante responsable del cambio de las frecuencias génicas.

II.6. VARIACIÓN DEL METABOLISMO SECUNDARIO POR EL AMBIENTE

Las células vegetales realizan procesos metabólicos comunes y esenciales para la vida celular, denominado en su conjunto, metabolismo primario. Pueden desarrollar, además, rutas que conducen a la formación de compuestos denominados metabolitos secundarios, es decir, compuestos químicos que cumplen funciones no esenciales, pero que les confieren claras ventajas selectivas. El término de “metabolismo secundario” fue

introducido en 1891 por Kossel (citado en Baas, 1989): "Mientras que los metabolitos primarios están presentes en cada célula de la planta que es capaz de reproducirse, los metabolitos secundarios están presentes sólo accidentalmente y no son imprescindibles para la vida".

Estos metabolitos secundarios, no son producidos al azar, han sido modelados y optimizados durante la evolución (Jarvis 2000). Su estudio ha implicado diversas ramas de la ciencia como la Ecología, Química Orgánica, Bioquímica, Zoología, Botánica, Sistemática, Micología, Fisiología, Biología Evolutiva, Agronomía, Antropología e incluso Arqueología (Seigler 1998). Son compuestos que intervienen en las interacciones ecológicas entre la planta y su ambiente, y pueden desempeñar una amplia variedad de funciones ecológicas. Durante muchos años el valor adaptativo de la mayoría de los metabolitos secundarios fue desconocido. En principio, fueron considerados productos finales de procesos metabólicos, sin función específica, o directamente como productos de desecho de las plantas. El estudio de estas sustancias fue iniciado por químicos orgánicos del siglo XIX y de principios del siglo XX, interesados en estas sustancias por sus propiedades medicinales, venenos, saborizantes, pegamentos, aceites, ceras, etc (Taiz *et al.* 2006).

Teniendo en consideración la relación de los metabolitos secundarios con el metabolismo primario, de los grupos químicos que forman sus moléculas y los cambios que éstas pueden experimentar, y considerando el número y la clase de precursores, enzimas y coenzimas que intervienen en la biosíntesis, podemos entender que numerosos factores ambientales, ya sean físicos, químicos y biológicos, tanto externos como internos, pueden afectar su producción. Las presiones que estos factores ejercen sobre las plantas, se modifican en el tiempo y en el espacio creando condiciones complejas y heterogéneas y ocasionando que las plantas pongan en juego diversos mecanismos de adaptación en la lucha por la superviviencia (Anaya Lang 2003).

Puede llamarse adaptación a toda característica definitiva de un organismo que le permite persistir en las condiciones de su hábitat (Whittaker *et al.* 1973), es decir, al ajuste fenotípico de un organismo a su ambiente. Tales rasgos aseguran cierto grado de éxito, ya sea permitiéndole a la planta hacer uso total de las cantidades de nutrientes, agua, o luz disponibles, o bien confiriéndole un alto grado de protección contra factores adversos, como son las temperaturas extremas, la sequía, los parásitos y los herbívoros (Root 1967).

Actualmente se cree que la mayoría de las adaptaciones ocurren por la acción selectiva del medio ambiente, determinando que algunas variantes genéticas dejen, en proporción, más descendientes que otras. Pero no todas las variaciones están genéticamente determinadas, es necesario, distinguir dos tipos principales de variaciones: variaciones inducidas por el ambiente (caracteres adquiridos o no heredados) y variaciones genéticamente determinadas (irreversibles, surgen únicamente por cambios en la estructura de los genes) (Daubenmire 1988).

Si una serie de plantas genéticamente idénticas crecen en regiones diferentes, hasta cierto punto, las características de cada individuo se desarrollan de acuerdo con el hábitat particular en el cual crece (Falconer & Mackay 1996). Los organismos deben continuamente regular y mantener sus capacidades funcionales en la medida que su ambiente varía, exhibiendo considerable plasticidad en sus respuestas a diferentes cambios, dependiendo de la severidad y duración de éstos. Esta plasticidad es evidente fenotípicamente a nivel de individuo y, genotípicamente en poblaciones y especies durante la adaptación evolutiva a diversos ambientes (Nespolo 2000). De este modo, el efecto genotípico provocado por la interacción con el ambiente en un individuo se denomina plasticidad fenotípica (Falconer 1989).

Teniendo en cuenta que la plasticidad fenotípica es un rango universal y se corresponde con la capacidad de un determinado genotipo de dar lugar a distintos fenotipos en distintas condiciones ambientales, el grado de plasticidad y, por lo tanto, la variación fenotípica, puede oscilar desde las diferencias más sorprendentes hasta los cambios más ligeros, según la constitución hereditaria de la planta. Además, se pueden distinguir variaciones morfológicas y fisiológicas. Las variaciones de naturaleza morfológica inducidas por el ambiente ocurren únicamente como resultado de una exposición contínua durante una gran parte del ciclo vital; pero los ajustes fisiológicos pueden aparecer en pocos días (Valladares 2006).

Las plantas pueden adaptarse a las condiciones ambientales cambiantes por la plasticidad o la selección sobre la variabilidad genética existente. Especies más plásticas presentan ventajas adaptativas en ambientes inestables, heterogéneos o de transición. Los cambios producidos pueden facilitar la exploración de nuevos nichos, dando como resultado el aumento de la tolerancia ambiental (Antonovics 2006; Levin 2009).

De este modo, dadas las funciones que desempeñan los compuestos derivados del metabolismo secundario, si una especie o población muestra variabilidad individual en la cantidad de esos compuestos implicaría una mejor respuesta frente a cambios ambientales, es decir, una mejor respuesta frente a la heterogeneidad ambiental. Debido a esto, el estudio de la variabilidad de los metabolitos secundarios brinda información respecto a la capacidad de respuesta que posee una especie en diferentes condiciones ambientales. Cuando la selección natural actúa sobre el fenotipo, la plasticidad fenotípica actúa como un importante mecanismo generador de variabilidad en determinados caracteres, de acuerdo con las demandas ambientales (Mal & Lovett-Doust 2005). Por lo tanto, conocer los componentes ambientales de la variación es fundamental para la comprensión de cómo una población se estructura en el tiempo y en el espacio.

Los factores ambientales que afectan a la expresión génica en plantas incluyen: factores bióticos como la interacción con organismos microbianos, herbívoros y otras especies de plantas; y factores abióticos como la luz, temperatura, anoxia, sequía, exceso y deficiencia de nutrientes. Los distintos tipos de estrés abióticos causan tanto efectos generales como específicos en el crecimiento y desarrollo de las plantas. Por ejemplo, la sequía limita el crecimiento de la planta debido a la disminución de fotosíntesis, al desequilibrio osmótico y a la baja disponibilidad de nutrientes. La salinidad interfiere con el crecimiento de la planta, ya que conduce a la sequía fisiológica y a toxicidad por iones (Zhu 2002). El frío también puede causar estrés osmótico, además de su efecto directo sobre el metabolismo (Thomashow 1999). Por lo tanto, el estrés osmótico y el estrés oxidativo parecen ser comunes consecuencias de la exposición a la sequía, salinidad y frío (Huang *et al.* 2012).

Según Anaya Lang (2003) la respuesta metabólica más común a la sequía, es la acumulación de aminoácidos (especialmente prolina), poliaminas, azúcares, betaína, colina e iones inorgánicos, necesarios para mantener el balance osmótico. La sequía puede provocar también, un incremento de diversos metabolitos secundarios: glucósidos cianogénicos, glucosinalatos, terpenoides, alcaloides y taninos condensados. Por ejemplo, se ha demostrado que poblaciones de *Isomeris arborea* que crecen en ambientes áridos producen mayores cantidades de glucosinalatos que las poblaciones presentes en ambientes no áridos (Blua *et al.* 1988).

Por otro lado, algunos estudios indican que en *Catharantus roseus*, la biosíntesis de alcaloides indólicos se encuentra bajo estricto control a nivel de células, tejidos y órganos

(St. Pierre *et al.* 1999; Rocha 2000), dependiendo en gran medida de los estados de desarrollo propios de la planta y del medio ambiente circundante (De Luca & St. Pierre 2000; Rocha & Leech 2002). En esta especie, plantas sometidas a estrés por sequía o salinidad, incrementan la producción de alcaloides indólicos, entre otros metabolitos secundarios (Jaleel *et al.* 2007a; Jaleel *et al.* 2007b; Jaleel *et al.* 2007c; Osman *et al.* 2007; Jaleel *et al.* 2008a; Jaleel *et al.* 2008b; Amirjani 2013). Más recientemente, Zhang *et al.* (2012) demostró el aumento de actividad en *C. roseus* de la enzima triptofano decarboxilasa (TDC) como respuesta al estrés por sequía. La TDC es una enzima clave en la biosíntesis de alcaloides indólicos, ya que por la conversión de triptófano en triptamina, conecta el metabolismo primario con el metabolismo secundario. El nivel de transcriptos de esta misma enzima también se ve incrementado, como respuesta al estrés por sequía, en otra especie productora de alcaloides indólicos, *Camptotheca acuminata* (Valletta *et al.* 2010).

Dada la función que desempeñan los metabolitos secundarios en las plantas, que exista variación intraespecífica puede tener un papel importante para la especie, ya que cuando el hábitat original sufre cambios, sus procesos fisiológicos deben actuar a un nuevo ritmo dictado por las nuevas intensidades de los factores. Por ejemplo, la competencia, la polinización y el herbivorismo son unos de los muchos procesos ecológicos que influyen en el estado de la planta, y todos ellos pueden variar con el fenotipo de la planta y depender de la composición química de la misma (Cariveau *et al.* 2004; Cahill *et al.* 2005, Moore & Foley 2005).

En presencia de la presión selectiva que ejercen otros organismos y el medio ambiente en general sobre las plantas, la ausencia de variabilidad en la defensa química implicaría una posible reducción de la población. Si la presión fuera suficiente y se mantuviera en el tiempo, esa población podría desaparecer. La supervivencia depende del grado al cual los caracteres heredados le permiten ajustarse al cambio ambiental (Stebbins 1950). De esta manera, una elevada variación química puede mejorar este proceso (Van der Meijden 1996).

II.7. ALCALOIDES EN EL GÉNERO *ASPIDOSPERMA*

Los alcaloides, constituyen uno de los grupos más importantes entre las sustancias naturales de interés terapéutico. El término alcaloide (derivado de álcali), fue propuesto por el farmacéutico W. Meissner en 1819, aplicándose a compuestos de origen vegetal con propiedades alcalinas, donde el carácter básico se debe a la presencia de nitrógeno amínico en su estructura. Si bien los alcaloides han sido aislados tradicionalmente de las plantas, de las cuales alrededor del 20% los contienen (De Luca & St Pierre 2000), actualmente se ha reportado la presencia de un número creciente de este tipo de metabolitos secundarios en animales, insectos, invertebrados marinos y microorganismos (Roberts & Wink 1998). En el reino vegetal, los alcaloides se encuentran presentes en las angioespermas, sobre todo en ciertas familias como Lauraceae, Magnoliaceae, Renunculacease Annonaceae, Menispermaceae, Papaveraceae, Fumariaceae, Rutaceae, Apocynaceae, Loganiaceae, Rubiaceae, y Solanaceae.

De acuerdo a la estructura molecular y las rutas de biosíntesis, los alcaloides pueden dividirse en cuatro clases: alcaloides verdaderos, protoalcaloides, pseudoalcaloides y alcaloides imperfectos (Vickery & Vickery 1981). Según Loyola-Vargas *et al.* (2004), también pueden clasificarse según su origen biogenético en: alcaloides derivados de aminoácidos (como ornitina/arginina, lisina, histidina, fenilalanina/tirosina, triptófano, del ácido antranílico y el ácido nicotínico); alcaloides purínicos; terpenos aminados; y alcaloides policétidos.

Entre los alcaloides derivados del triptófano se encuentran los alcaloides indólicos (monoterpén indólicos - AMIs). Los AMIs conforman una familia de más de 3000 miembros, de los cuales sólo en algunos casos se conoce su efecto fisiológico en los mamíferos (Kutchan 1995; Geerlings *et al.* 2000). Este tipo de alcaloides se han encontrado en varias familias vegetales, pero principalmente en las Apocinacea, Loganiaceae, Nissaceae y Rubiaceae, todas del orden Gentianales. Entre las plantas más conocidas y estudiadas que producen AMIs se tienen a tres especies pertenecientes al género Apocinaceae: *Catharanthus roseus*, *Tabernaemontana*, y *Rauvolfia serpentina* (Waterman 1998; Cordell 1999).

Dentro de los AMIs pueden reconocerse 8 subgrupos: corinante, aspidosperma, iboga, estricnano, plumerano, eburnano, valesiacontamano y aparicino (Kutchan *et al.* 1991).

Estos subgrupos se diferencian dependiendo del modo de ciclización después de la remoción del residuo de glucosa de la estrictosidina.

Se han realizado numerosas investigaciones sobre los alcaloides indólicos presentes en el género *Aspidosperma*. Gilbert (1966) estudió 33 especies de *Aspidosperma* presentes en Brasil, aislando más de 100 alcaloides indólicos, lo que evidencia la predominancia de esta clase de alcaloides en el género (Oliveira *et al.* 2009 b). Pereira *et al* (2007) realizaron un estudio exhaustivo de las estructuras de los alcaloides indólicos identificados en especies del género *Aspidosperma*, donde gracias a esta revisión fue posible observar la diversidad estructural de 247 alcaloides indólicos aislados hasta 2006 en este género (ver sección *II.2.5.* Usos madereros y medicinales).

La mayoría de los alcaloides indólicos actúan como agonistas parciales de los receptores α-adrenérgicos, serotoninérgicos, dopaminérgicos, colinérgicos y noradrenérgicos. Cada clase de receptor tiene varios subtipos, con diferente sensibilidad a varios compuestos, de allí se deduce el gran número de actividades de los alcaloides indólicos en diversos órganos (Biel *et al.* 1959; Roberts & Wink 1998).

II.7.1. Biosíntesis de AMIS - generalidades

En *C. roseus,* la especie modelo en el estudio de la biosíntesis de AMIs, este proceso es complejo (Figura II.5) y requiere de la conjunción de dos vías metabólicas: la vía indólica y la vía terpénica (Meijer *et al.* 1993; De Luca 1993; Kutchan 1995; Vazquez-Flota *et al.* 1997; Van der Fits & Memelink 2000; De Luca & Laflamme 2001; Memelink *et al.* 2001; Endt *et al.* 2002; Gantet & Memelink 2002).

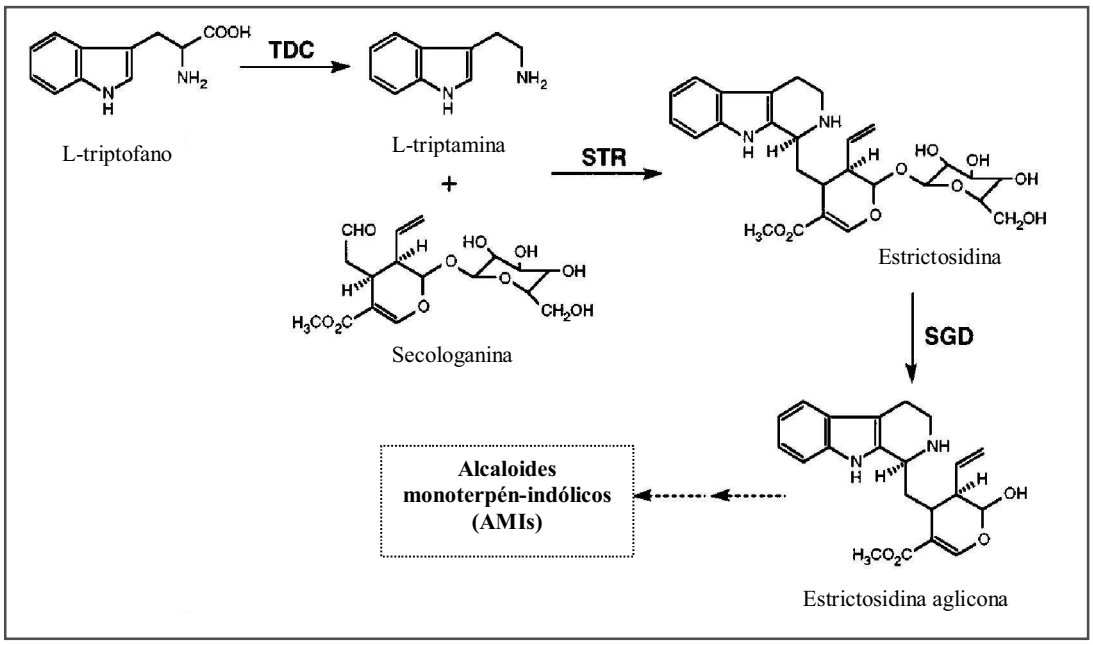


Figura II.5. Reacciones catalizadas por las enzimas implicadas en la biosíntesis de los alcaloides monoterpén indólicos. Triptófano descarboxilasa (TDC); Estrictosidina sintasa (STR) y Estrictosidina β-D-glucosidasa (SGD). La imagen ha sido adaptada de Facchini (2001).

La enzima L-aminoácido-aromático carboxilasa (EC 4.1.1.28), de nombre común triptofano decarboxilasa (TDC), cataliza la conversión de L-triptofano a L-triptamina, el derivado indólico de los AMIs. La triptamina y la secologanina, el precursor monoterpén-glucoiridoide, son condensados para formar estrictosidina. La enzima que cataliza la condensación de la triptamina y de la secologanina es la 3-α(S)- estrictosidina triptamina-liasa (EC 4.3.3.2) de nombre común estrictosidina sintasa (STR). El producto de esta reacción, la 3α (S) estrictosidina, es desglucosilado por la estrictosidina β-D-glucosidasa (EC 3.2.1.105) (SGD) para formar finalmente la molécula de estrictosidina aglicona, precursor de los aproximadamente 200 alcaloides indólicos en *C. roseus*. La estrictosidina aglicona se convierte espontáneamente en 4, 21-didehidrogeissoschizina, la cual puede ser transformada en catenamina, que es el precursor directo de la ajmalicina y de la serpentina, o puede ser reducida enzimáticamente a geissoschizina en *C. roseus*.

Por catalizar pasos cruciales de la biosíntesis de los AMIs, las enzimas TDC, STR y SGD han sido ampliamente estudiadas y clonadas en especies como *C.roseus* y *R. serpentina* (De Luca & Cutler 1987; Stevens *et al.* 1993b). La enzima triptófano descarboxilasa (TDC) juega un papel clave en la biosíntesis de alcaloides, vinculando el metabolismo primario y secundario (Valletta *et al.* 2010).

El ADNc de TDC fue aislado por primera vez en *C. roseus* (De Luca *et al.* 1989), y luego en otras especies como *Camptotheca acuminata* Decne. (López-Meyer & Nessler 1997), *Ophiorrhiza pumila* (Yamazaki *et al.* 2003), *Oryza sativa* L. (Kang *et al.* 2007) y *Capsicum annuum* (Park *et al.* 2009). En *C. roseus*, la TDC es una enzima citoplásmica formada por dos subunidades idénticas de 55 kDa, tiene una masa molecular aproximada de 110 kDa, un pI de 5.9 y un pH óptimo de 8.5. Los transcriptos de *tdc*, al igual que los de *srt1* se encuentran localizados en la epidermis de tallos, capullos y hojas de *C. roseus* (St Pierre *et al.* 1999; De Luca & St Pierre 2000; Irmler *et al.* 2000).

La enzima estrictosidina sintasa (STR) presente en las vacuolas, ha sido clonada a partir de *R. serpentina* y *C. roseus*. Stevens *et al.* (1993 b) determinaron la presencia de al menos cuatro isoformas de esta enzima en cultivos de *Cinchona robusta* Howard (Rubiaceae).Se han identificado también algunos genes similares en soja, *Arabidopsis thaliana* e incluso en animales, incluyendo al hombre (Fabbri *et al.* 2000; De Luca & Laflamme 2001).

Por otra parte, la enzima estrictosidina β-D-glucosidasa (SGD) es una enzima soluble asociada a la cara citoplasmática del retículo endoplasmático en células vegetales. Ha sido expresada, purificada y cristalizada a partir de *R. serpentina* (Barleben *et al.* 2005) y de *C. roseus.* La SGD tiene una masa de 63 KDa., y en *C. roseus* se encontraron dos isoformas, codificadas por un único gen (Geerlings *et al.* 2000). De Luca & Laflamme (2001) demostraron que los transcriptos de *sgd* y la expresión de los mismos es más abundante en tejidos del tallo y de las hojas en *C. roseus*.

Además, respecto a su función en las plantas algunos estudios han demostrado que la biosíntesis de alcaloides podría ser regulada por estímulos bióticos y abióticos, siendo activada en distintas etapas del desarrollo de la planta, donde las enzimas TDC, STR y SGD juegan un importante papel en la respuesta ante el estrés y como defensa (Meisner *et al.* 1981; Chockalingam *et al.* 1989; Luijendijk *et al.* 1996; Geerlings *et al.* 2000; Facchini 2001; Guirimand *et al.* 2010).

II.8. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS ESPECÍFICOS

II.8.1. Hipótesis

Se propusieron dos hipótesis de trabajo:

H1. La diversidad intrapoblacional es mayor que la interpoblacional en la especie forestal nativa *A. quebracho blanco.*

H2. Existe variabilidad en el nivel de expresión de genes que codifican enzimas involucradas en la vía de síntesis de alcaloides en distintos grupos poblacionales, en relación con el gradiente de humedad. Esta hipótesis se basa en la presunción que diferentes valores de precipitación media anual da lugar a cambios en el nivel de expresión de genes a nivel de ARNm.

II.8.2. Objetivos específicos

1. Estudiar la diversidad genética de *A. quebracho-blanco* mediante el uso de marcadores moleculares RAPDs con el fin de evaluar la estructura genética poblacional.

2. Caracterizar por secuenciación las bandas obtenidas como marcadores RAPDs, a fin de identificar secuencias diferenciales o características de distintos grupos poblacionales.

3. Identificar y determinar el nivel de expresión de genes que codifican enzimas involucradas en la vía de síntesis de alcaloides, para evaluar si existe diferencia en la expresión en correlación con el gradiente de humedad.

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

III.1. SITIOS EXPERIMENTALES

En el presente trabajo se priorizó el análisis de áreas naturales protegidas en el Gran Chaco Argentino, ecoregión Chaco Seco, caracterizadas por la presencia dominante de *A. quebracho-blanco*. Con este fin se identificaron cinco sitios experimentales (cuatro de ellos corresponden a áreas protegidas), que abarcan gran parte de la distribución geográfica de la especie en el Chaco Seco, subregiones Chaco Árido y Chaco Serrano (Tabla III.1 y Figura III.1), a saber:

- **Reserva Natural Provincial Quebracho de la Legua (QL)**, en la subregión del Chaco Árido, de la provincia de San Luis, Argentina;
- **San Jerónimo (SJ)**, en la subregión del Chaco Árido, de la provincia de San Luis, Argentina;
- **Parque Provincial Bajo de Véliz (BV)**, en la subregión Chaco Serrano, de la provincia de San Luis, Argentina;
- **Parque Natural Provincial y Reserva Forestal Natural Chancaní (C)**, en la subregión del Chaco Árido, de la provincia de Córdoba, Argentina;
- **Campo experimental del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) "La María" (SG),** en la subregión del Chaco Árido, de la provincia de Santiago del Estero, Argentina.

Tabla III.1. Localización de los sitios experimentales: Parque Provincial Bajo de Véliz (**BV**), Reserva Natural Provincial Quebracho de la Legua (**QL**), Parque Natural Provincial y Reserva Forestal Natural Chancaní (**C**), San Jerónimo (**SJ**) y Campo Experimental INTA La María-Santiago del Estero (**SG**).

Sitios Experimentales	Latitud	Longitud	Área protegida	Precipitación
QL	32° 21' S	66° 55' O	2242 has	100-200 mm
SJ	33° 07' S	66° 30' O	------	200-300 mm
BV	32° 16' S	65° 24' O	6000 has	600 mm
C	31° 22' S	65° 29' O	4960 has	450 mm
SG	28° 01' S	64° 13' O	7500 has	550 mm

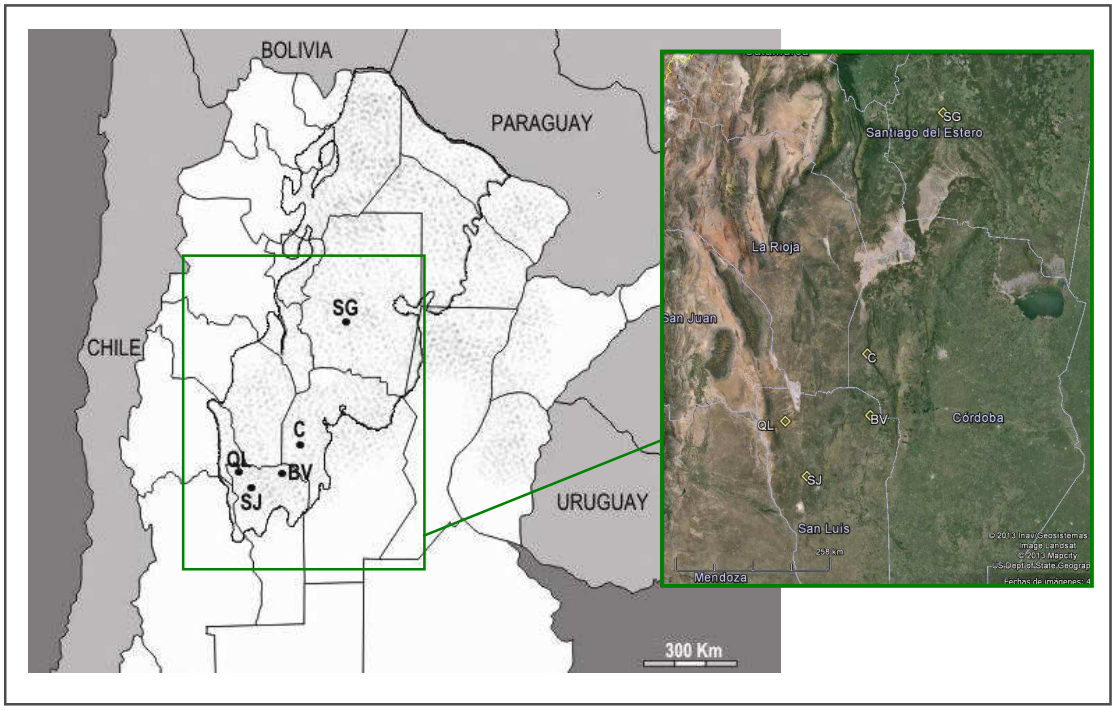


Figura III.1. Localización de los sitios experimentales: Reserva Natural Provincial Quebracho de la Legua (QL), San Jerónimo (SJ), Parque Provincial Bajo de Véliz (BV), Parque Natural Provincial y Reserva Forestal Natural Chancaní (C) y Campo Experimental INTA "La María" - Santiago del Estero (SG). El área punteada en color gris, corresponde a la distribución geográfica de *A. quebracho-blanco*, según Dimitri *et al.* (1997); el área limitada por el borde negro corresponde la subregión Chaco Árido, del Gran Chaco Argentino. En el recuadro de color verde se muestra una foto satelital del área de estudio.

III.1.1. Reserva Natural Provincial Quebracho de la Legua

***Subregión**:* Chaco Árido (Cabrera 1994; Naumann & Madariaga 2004).

Localización y superficie: se encuentra en el cuadrante NO de la provincia de San Luis, en el departamento Ayacucho, sobre la llanura occidental de las Sierras de San Luis (32° 21' S – 66° 55' O). Dista unos 137 km de la Ciudad Capital de San Luis, ubicado sobre RN Nº 20, a 9 km al este del empalme con RN Nº 147, en el paraje de "La Chañarienta" (Figura III.2).

Se trata de un polígono irregular de 2242 has de superficie protegida atravesado, de este a oeste, por la RN 20, que lo divide en dos cuadros (Ley N° IX-0309-2004 5421 – Art.3b Áreas Naturales protegidas de la provincia de San Luis).

***Características**:* es una formación en estado prístino compuesta por *A. quebracho-blanco* como especie dominante, siendo esta reserva el relicto más importante de la especie en la provincia de San Luis. En la Figura III.3 se muestra la entrada a la reserva y una imagen aérea de este sitio experimental.

Figura III.2. Localización de la Reserva Natural Provincial Quebracho de la Legua, sobre la RN 20, en el paraje "La Chañarienta", provincia de San Luis.

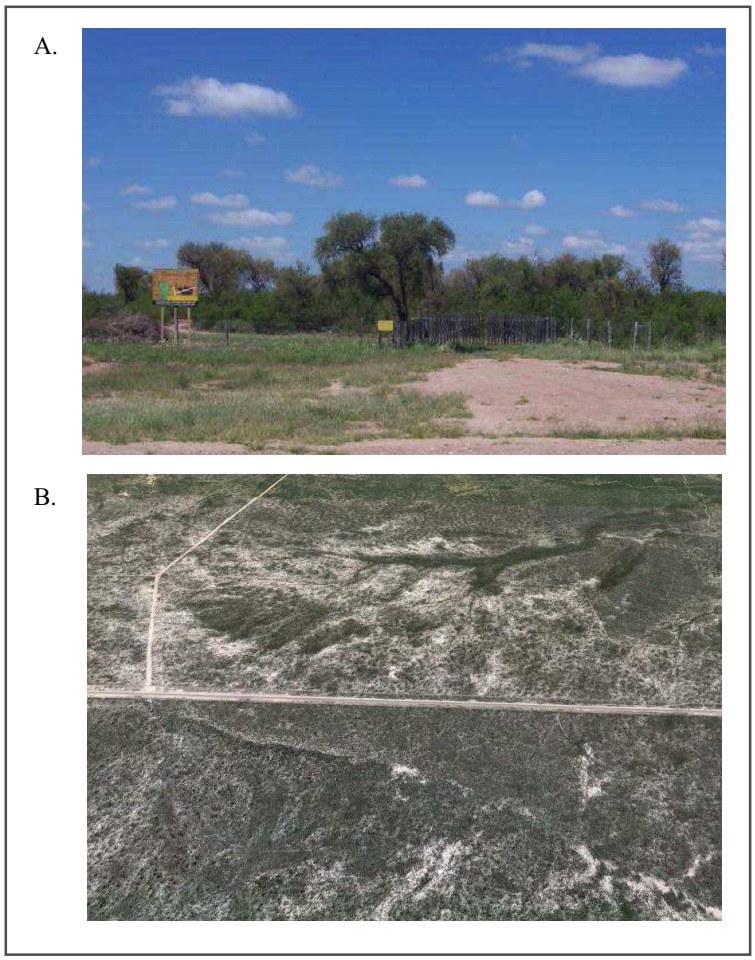


Figura III.3. A. Entrada a la Reserva Natural Provincial Quebracho de la Legua. B. Vista aérea del sitio experimental QL, sobre la RN 20.

El terreno es plano, con suaves ondulaciones, con suelos predominantemente arenosos. Desde hace más de 30 años el campo está alambrado, de modo que la masa boscosa se ha desarrollado sin influencia humana o de animales domésticos. Se trata de bosquecillos tupidos de *A. quebracho-blanco,* en el estrato superior, esta especie se encuentra asociada a algarrobos, especialmente a *Prosopis flexuosa* (algarrobo negro). En el estrato medio se encuentran *Prosopis torquata* (tintitaco)*, Mimozyganthus carinatus* (lata), *Geoffroea decorticans* (chañar)*, Bulnesia retama* (retamo), *Cercidium praecox* (brea), *Larrea divaricata* (jarilla), *Capparis atamisquea* (atamisque), *Condalia microphylla* (piquillín), *Monttea aphylla* (ala de loro), *Ximenia americana* L. (albarcoque) y otros arbustos. El

estrato bajo, en tanto, es rico en subarbustos y especialmente herbáceas, sobre todo *Pappophorum mucronulatum* (pasto criollo), *Trichloris crinita* (pasto de hoja), *Sporobolus pyramidatus* (pasto del niño), *Digitaria californica* (pasto plateado), *Neobouteloua lophostachya* (pasto crespo), *Aristida mendocina* (saetilla negra), *Gouinia paraguayensis* (avenilla), *Setaria leiantha y Setaria leucopila* (colas de zorro), etc. Son también abundantes las cactáceas, como *Opuntia sulphurea* y *Cereus aethiops* (pencas), al igual que algunas bromeliáceas terrestres como *Deinacanthon urbanianum* (chaguar) y epífitas como *Tillandsia aizoides* y *Tillandsia xiphioides* (claveles del aire) (Del Vitto *et al.* 1994).

***Clima**:* el clima es templado seco de sierras y bolsones, con gran amplitud térmica entre el día y la noche. La temperatura media de enero es de 27 ºC y la temperatura media de julio es de 9 ºC. Presenta pocos vientos húmedos y las lluvias se presentan en verano de forma torrencial. La precipitación media anual oscila entre los 100 y los 200 mm.

III.1.2. San Jerónimo

***Subregión**:* Chaco Árido (Cabrera 1994; Naumann & Madariaga 2004)

***Localización**:* esta localidad se encuentra ubicada sobre RN Nº 147, a unos 27 km de la Ciudad Capital de San Luis (Figura III.4).

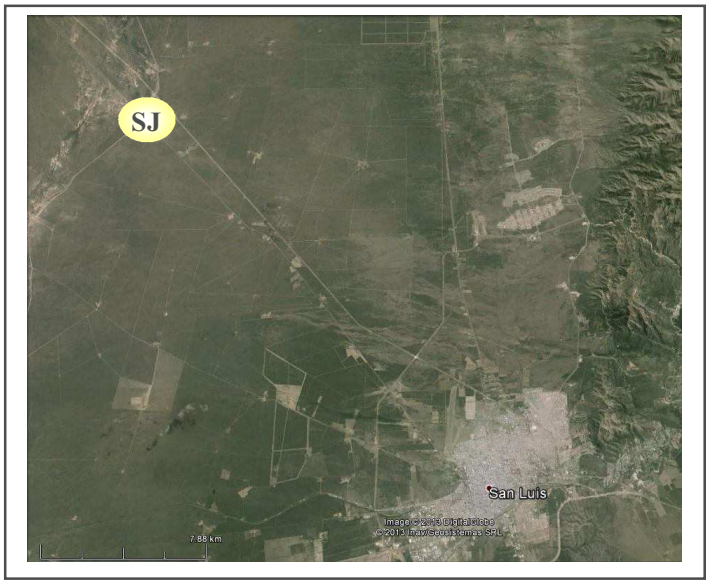


Figura III.4. Localización del sitio experimental San Jerónimo.

***Características**:* se trata de un bosque bajo, ubicado en el sector de la bajada oriental de la Sierra del Gigante, en las proximidades de la localidad de San Jerónimo (Figura III.5). Presenta escaso relieve, muy suave con pendientes menores a 1º sobre las cuales discurre el curso fluvial efímero, concentrándose en las regiones centrales de la depresión, formando parte de la cuenca hídrica del bebedero.

Clima: las condiciones climáticas de esta región son: medias térmicas anuales de 17.1 ºC; media máxima en enero de 24.2 ºC, con picos de hasta 34 ºC y media mínima en junio de 9.9 ºC (Datos Aeropuerto local: años 1997 al 2001). Las precipitaciones se encuentran en el rango 200-300 mm anuales.

A.

B.

Figura III.5. A. Vista aérea del sitio experimental San Jerónimo. B. Ejemplar de *A. quebracho-blanco* en SJ.

III.1.3. Parque Provincial Bajo de Véliz

***Subregión**:* Chaco Serrano (Cabrera 1994; Naumann & Madariaga 2004).

Localización y superficie: se encuentra ubicado a 230 km de la ciudad San Luis, en el sector noreste de la Sierra de San Luis (35° 50` S – 64° 20`O), al oeste de la localidad de Santa Rosa del Conlara (Figura III.6).

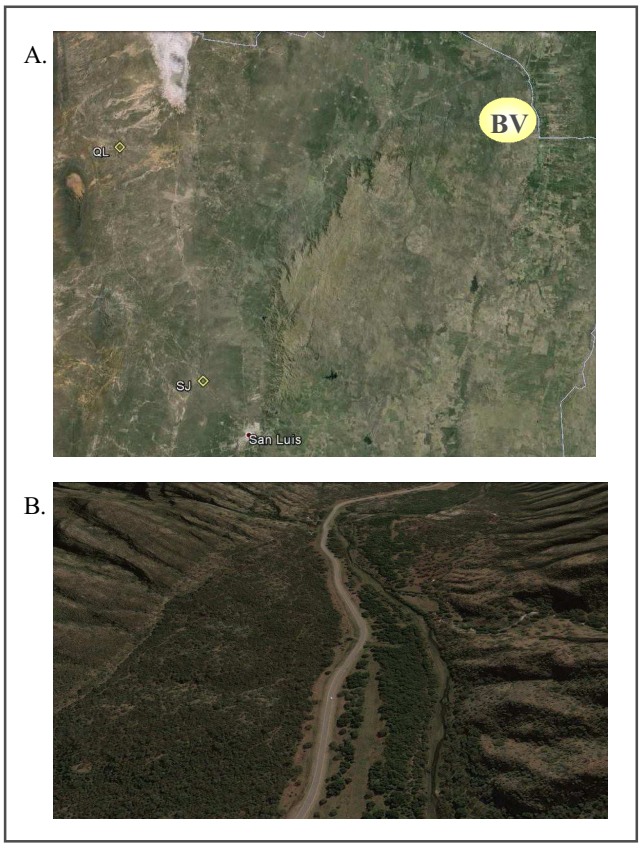


Figura III.6. A. Localización del Parque Provincial Bajo de Véliz. B. Vista aérea de la profunda depresión perteneciente al sitio experimental BV.

El Parque Provincial Bajo de Véliz forma parte del Sistema de Áreas Naturales Protegidas de la Provincia de San Luis (Ley Nro. IX-0309-2004), comprendiendo un área de 6000 has. El Parque comprende una profunda depresión tectónica que presenta un desnivel aproximado de 150 m, con una longitud de 12 Km en dirección N-S y su ancho oscila entre los 800 m en su parte S y 1200 m al N. El área tiene una altura máxima de 900

m.s.n.m. y en la parte más deprimida desciende hasta los 560 m.s.n.m. (Almandoz 1993). Se encuentra surcado de S a N por el río Cautana el cual da lugar a la formación de los Bañados de Cautana en la porción nororiental.

***Características**:* la localidad de Bajo de Véliz se encuentra emplazada en una depresión tectónica desarrollada sobre rocas ígneas y metamórficas de edad Precámbrica a Paleozoica, en el sector noreste de la Sierra Grande de San Luis (Hünicken *et al.* 1981, Kilmurray & Villar 1981). Esta unidad serrana constituye uno de los bloques tectónicos más australes de la Provincia Geomorfológica de las Sierras Pampeanas (Ojeda 2005).

En el área se han preservado depósitos lacustres y sedimentarios de origen gondwánicos, pertenecientes a los períodos Carbonífero y Pérmico, con una antigüedad de 320 a 286 millones de años. Estos sedimentos constituyen la Formación geológica Bajo de Véliz, la cual tiene 164 m de espesor, con su base y tope bien definidos, dividido en 3 miembros: Cautana (inferior), Pallero (medio) y Lomas (superior), cuyas sedimentitas paleozoicas se formaron en un ambiente lacustre y aluvional (Hünicken & Pensa 1975; Videla 2012).

Respecto a la vegetación presente en el Parque, la formación característica de la depresión tectónica es un bosque xerófilo bajo, triestratificado, relativamente cerrado. Se trata de una comunidad homogénea con especies características de llanura como *Prosopis* spp. y *A. quebracho-blanco*, acompañada por *Celtis ehrenbergiana* (como vegetación edafohigrófila), *Ruprechtia apetala* y *Jodina rhombifolia*. Como especies diferenciales encontramos a *Geoffroea decorticans*, *Cercidium praecox, Caesalpinia gilliesii, Acacia furcatispina, Acacia caven y Larrea divaricata* (Ciuffo *et al.* 2010).

En las laderas que circundan la depresión, se manifiesta *Lithrea molleoides* por debajo de los 800 m, como individuos aislados inmersos en una matriz de gramíneas y dicotiledóneas nativas. Por otra parte, se encuentra en quebradas y faldeos más húmedos (zonas de escorrentía), acompañado de numerosas especies de herbáceas, dicotiledóneas y gramíneas. En la transición se encuentra un arbustal donde se destacan *Heterothalamus alienus, Eupatorium buniifolium y Flourencia oolepis* (más abundante en sitios afectados por fuego). A mayor altura se encuentra una formación herbácea alta semidensa de poáceas (*Bouteloa sp, Stipa* spp.) con arbustos entremezclados.

Están presentes en el Parque tres ejemplares de *Caesalpinia paraguariensis* (D. Parodi) Burkat, (guayacán), el "árbol de la vida", como lo llaman los pobladores de

Pizarras de Bajo de Véliz, siendo estos los ejemplares de distribución más austral de la especie. *C. paraguariensis* es típica de climas más templados, estando representado en la provincia de San Luis, por sólo estos tres ejemplares en Bajo de Véliz. Este árbol legendario fue ya mencionado por Kurtz como ejemplar aislado en 1883 (Demaio 2002), constituyendo una atractivo más del lugar, y ha formado una insólita unión con otro ejemplar de su especie, donde sus troncos se retuercen y entrecruzan entre sí. Probablemente se trata de individuos relictuales (Ciuffo *et al*. 2010).

Clima: el norte de la provincia de San Luis tiene un clima continental semiárido, con pronunciadas variaciones de temperatura entre el día y la noche. Las precipitaciones son escasas y están distribuidas entre los meses de octubre y marzo, situándose dentro de las isohietas de los 500 y 600 mm anuales, con temperaturas medias máximas de 23 ºC en Enero y una media mínima de 9 ºC en Julio (Videla 2012). Los vientos de mayor frecuencia son del norte y del sur, de menor importancia los provenientes del E y O, siendo los vientos del NE los que aportan humedad (Almandoz 1993).

Figura III.7. Ejemplar de *A. quebracho-blanco* presente en el sitio experimental BV, con las Sierras de San Luis de fondo. En la fotografía conjunta se observa el arroyo Cautana que surca la depresión del Parque BV.

Figura III.8. Vista del miembro Lomas, en la Formación geológica Bajo de Véliz.

III.1.4. Parque Natural Provincial y Reserva Forestal Natural Chancaní

Subregión: pertenece a la subregión Chaco Serrano (Cabrera 1994).

Localización y superficie*:* se encuentra ubicado al noroeste de la provincia de Córdoba, en el Departamento de Pocho (31° 22' S, 65° 29'O). Comprende en sus 4.960 has de dominio fiscal (Decreto Reglamentario Nº 6573/86) la Quebrada de la Mermela y parte del faldeo y valle sobre la vertiente occidental de la Sierra de Pocho (Figura III.9).

Características*:* El bosque primario de la Reserva cuenta con características de masa forestal únicas en la región (Bonino 2002; Bonino & Araujo 2005), permaneciendo libre de disturbios de origen antrópico desde su creación en 1986 (Pelegrin & Bucher 2010). Es un bosque abierto de tres estratos: un estrato alto, compuesto exclusivamente por *A. quebracho-blanco*; un estrato intermedio, compuesto por juveniles de *A. quebracho-blanco* y otras especies arbóreas y arbustivas; y un estrato menor, muy denso, compuesto de renovales de árboles y arbustos (Bonino 2006).

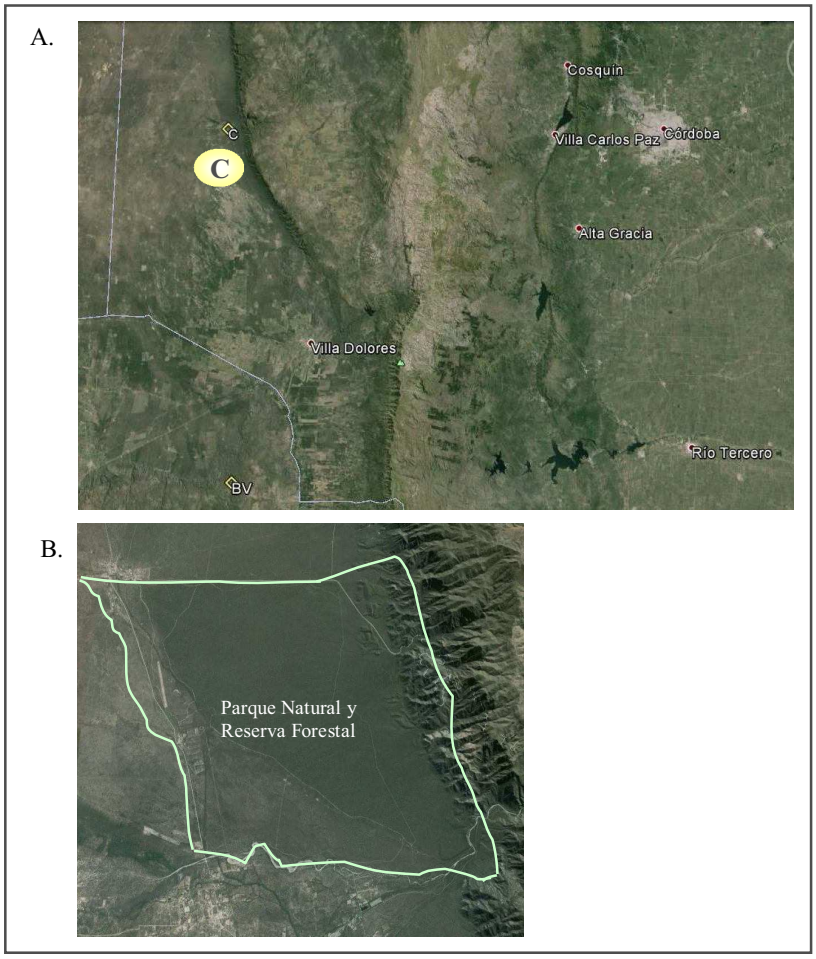


Figura III.9: A. Localización del Parque Natural y Reserva Forestal Chancaní, Dpto. Pocho, Provincia de Córdoba. B. Vista aérea del sitio experimental C, donde se demarca la superficie protegida.

Predominan bosques xerófilos, ralos y bajos, compuestos principalmente por *A. quebracho-blanco* y *P. flexuosa*. Aparecen también, aunque con menor porte, *Prosopis pugionata* (alpataco o algarrobo de las salinas) y *P. torquata*. Las acompañan especies menos abundantes como *Celtis ehrenbergiana* (tala) y *Zizyphus mistol* (mistol) (Karlin & Díaz 1984; Karlin *et al.* 1992) (Figura III.10).

Los suelos son tipo limo-arenosos, buena permeabilidad, tipo pardo, textura franca y estructura granular, con tenores de materia orgánica (0,5 % a 2 %) y nitrógeno (0,05 a 0,10 %) escasos (Karlin *et al.* 1992).

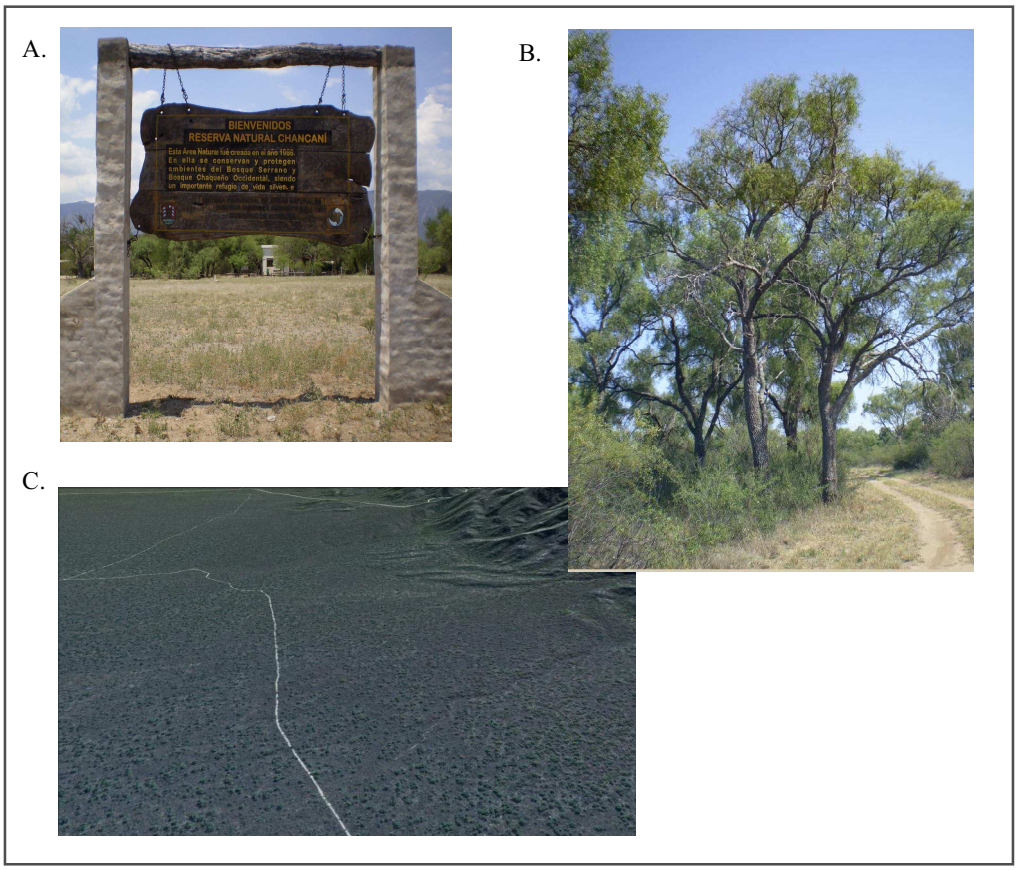


Figura III.10. A. Entrada al Parque Natural Provincial y Reserva Forestal Natural Chancaní. B. Ejemplar de *A. quebracho-blanco* presente en este sitio experimental. C. Vista aérea del sitio experimental C.

Clima: El clima es altamente estacional, con una pronunciada estación seca. Existe en la zona una gran amplitud térmica diaria, tanto en verano como en invierno, siendo la máxima media anual de verano de 33,5 ºC, mientras que la mínima en invierno es de 5,9 ºC (Karlin *et al*. 1992). El promedio de precipitaciones anuales es de 450 mm, con un 70 % de las mísmas, concentradas en los 4 meses más cálidos (Karlin *et al*. 1992).

Las características del suelo, y las altas temperaturas, provocan un gran déficit hídrico anual, siendo el índice hídrico de -20, y la evapotranspiración de 1000 a 1200 mm anuales. Predominan vientos del noroeste, secos y cálidos (Karlin & Díaz 1984).

III.1.5. Campo Experimental INTA La María - Santiago del Estero

***Subregión*:** pertenece a la subregión Chaco Árido (Cabrera 1994).

***Localización y superficie*:** el Campo Experimental INTA La María se encuentra ubicado en Ruta Nacional Nº 9, km 1109, a 30 km al sur de la ciudad de Santiago del Estero (28° 01' 00" latitud sur, 64° 13' 00" longitud oeste) (Figura III.11). Está emplazado a 169 msnm, en la zona de transición de la llanura aluvial del Río Dulce y la planicie pedemontana de las Sierras de Guasayán (Lorenz 1995). En la Figura III.12 se muestran en detalle las parcelas de muestreo.

Características: posee un estrato arbóreo integrado por *Schinopsis quebracho colorado* (quebracho colorado) y *A. quebracho-blanco* como especies principales. En el piso intermedio están presentes *P. nigra* (algarrobo negro), *Z. mistol* y *C. praecox*. El estrato arbustivo está compuesto por diversas especies como *Acacia furcatispina Burk.* (garabato), *Acacia aroma Gill. Ap. Hook. et Arn.* (tusca), *C. ehrenbergiana*, *C. atamisquea*, *X. americana* L., *C. microphylla*, *L. divaricata*, *Lippia turbinata Griseb* (poleo), etc. (Araujo *et al.* 2008). El estrato herbáceo está constituido por especies de gramíneas y latifoliadas (Brassiolo *et al.* 1993) (Figura III.13).

El bosque del Campo La María tiene 224 árboles por ha de los que 110 corresponden a la especie que en estudio, con un área basal de 6,6 m^2/ha y una altura media de 6,4 m. El 60% de los individuos y el 62% del área basal pertenecen a las dos especies de quebrachos (Brassiolo *et al*. 1993).

Esta zona forma parte de una planicie loéssica, con suelos ligeramente poco profundos sin estructura o débilmente estructurados. No presentan un horizonte de acumulación de arcilla, la textura es franco limosa y poseen buen drenaje.

Clima: el clima es continental con veranos muy calientes (hasta 45º C) e inviernos fríos (hasta -10º C). Las precipitaciones medias anuales en el Campo La María rondan los 550 mm con distribución estacional, comenzando a fines de la primavera y finalizando en el otoño. El balance hídrico es negativo durante todo el año (Boletta 1988).

A.

B.

Figura III.11. A. Vista aérea del Campo Experimental INTA – La María, Prov. de Santiago del Estero. B. Localización del sitio experimental SG.

Figura III.12. Parcelas de muestreo en el Campo La María – INTA, Prov. de Santiago del Estero.

Figura III.13. Caminos internos y bosque Nativo en el Campo La María – INTA, Prov. de Santiago del Estero.

III.2. OBTENCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL

Se recolectó material foliar, preferentemente tejido meristemático joven, de 129 ejemplares adultos de *A. quebracho-blanco* en buenas condiciones de sanidad, presentes en los cinco sitios de estudio descriptos anteriormente (Sección III.1): Reserva Natural Provincial Quebracho de la Legua (QL); San Jerónimo (SJ); Parque Provincial Bajo de Véliz (BV); Parque Natural Provincial y Reserva Forestal Natural Chancaní (C) y Campo experimental del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) "La María" (SG).

Dentro de cada población, de ejemplares elegidos al azar, se recolectaron las hojas, considerando una distancia mayor a 20 m entre los ejemplares. Esto se realizó a los efectos de reducir el muestreo de individuos emparentados o idénticos (Gillies *et al.* 1999), incrementando la posibilidad de detectar la potencial diversidad genética intrapoblacional.

Las muestras fueron colocadas en bolsitas de celofán individuales, debidamente identificadas y almacenadas de forma refrigerada durante el período de recolección y durante el traslado al laboratorio. Se determinaron las coordenadas y la altitud de cada sitio mediante un Geoposicionador-GPS, Global Positioning System. Una vez en el laboratorio, se conservaron a -80 ºC por un período de uno a tres días hasta la extracción del ADN y del ARN de las mismas.

III.3. EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

III.3.1. Extracción de ADN genómico

III.3.1.1. Consideraciones

La extracción de ADN a partir del tejido foliar se realizó siguiendo el método de Doyle & Doyle (1987) que utiliza el detergente CTAB (bromuro de N-cetil-N, N, N-trimetilamonio), ampliamente utilizado en plantas.

En presencia de altas concentraciones de sales, el CTAB, permite una mejor eliminación de contaminantes como polisacáridos, compuestos fenólicos y metabolitos

secundarios que pueden interferir con ensayos posteriores, como la amplificación por la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

En este trabajo la obtención de ADN nuclear de *A. quebracho-blanco*, se realizó según el siguiente protocolo que presenta cinco etapas básicas (Ferreira & Grattapaglia 1996):

1. *Maceración mecánica:* Esta etapa tiene como objetivo liberar a las células de la mayor cantidad posible de pared celular, rica en polisacáridos, obteniéndose protoplastos más susceptibles a la acción del detergente.

2. *Resuspensión del tejido vegetal en buffer de extracción:* Permite la solubilización de las membranas lipoproteícas y la desnaturalización de proteínas, en tanto que el ADN es protegido de la acción de enzimas degradativas. Para cumplir estas funciones el buffer de extracción tiene pH entre 8,0 y 9,0 ya que la mayoría de las enzimas lipolíticas y lipoxigenasas tienen un pH óptimo entre 5,0 y 6,0, y las ADNasas nucleares tienen un pH óptimo en torno a 7,0. Por otra parte, la presencia de NaCl permite la solubilización del detergente y es esencial para la precipitación del ADN en presencia de alcohol.

Para prevenir la acción degradativa de enzimas nativas o de compuestos secundarios liberados por la ruptura celular, se agregan distintos componentes: EDTA (ethylene diamine tetra acetate) como quelante de cationes bivalentes como magnesio y calcio (Mg^{2+} y Ca^{2+}), inhibiendo de este modo la acción de ADNasas dependientes de metales; y el agente reductor β-mercapto etanol, que protege al ADN de las actividades de enzimas como peroxidasas y polifenoloxidasas, desnaturalizándolas e inhibiendo la acción de otras enzimas.

La suspensión obtenida, se somete a una temperatura de 60 - 70°C para facilitar la solubilización y homogeneización de la mezcla. Esta temperatura contribuye también a inhibir la acción de enzimas degradativas, tanto por la reducción en su actividad ya que no es la temperatura óptima de las mismas, como por desnaturalización.

3. *Extracción con solventes orgánicos:* Se utiliza una mezcla de cloroformo/ alcohol isoamílico, donde las fases orgánica y acuosa se separan por centrifugación. En esta extracción, en la fase orgánica quedan retenidos lípidos, proteínas y la mayoría de los polisacáridos; mientras que ADN, ARN y algunos polisacáridos quedan en la fase acuosa.

4. Agregado de alcohol: Los ácidos nucleicos en presencia de alcohol (isopropanol, etanol) y sales (NaCl), forman un precipitado frecuentemente visible que puede ser

sedimentado por centrifugación. Este precipitado debe ser lavado 2 o 3 veces con alcohol para eliminar las sales remanentes.

5. *Resuspensión en Tris/EDTA o en agua:* El ADN obtenido es resuspendido en buffer TE (Tris/ EDTA) o en agua MilliQ. En este momento es posible también realizar un tratamiento con ARNasas, obteniéndose de esta manera ADN genómico puro. Se recomienda resuspender en agua ultrapura MilliQ el ADN obtenido, si este va a ser utilizado como templado de una reacción de PCR, ya que el EDTA del buffer TE actúa como quelante de iones Mg^{2+}, interfiriendo en la optimización de la reacción.

III.3.1.2. Método de Doyle & Doyle (1987)

Reactivos utilizados:

- Buffer de extracción CTAB 2% (pH 7,8)
- Cloroformo: isoamílico (24:1)
- Isopropanol absoluto frío (almacenado en freezer a -20°C)
- Etanol 70% frío (almacenado en freezer a -20°C).

Protocolo experimental:

1. Pesar 100 mg de tejido foliar y lavar el material con agua destilada. Macerar mecánicamente en mortero, hasta lograr que el tejido esté perfectamente molido. Colocar el material foliar macerado en un tubo eppendorf (1,5ml) previamente identificado.

2. Agregar 500 µl de buffer de extracción a cada tubo.

3. Incubar a 37°C toda la noche o a 60°C durante dos horas.

4. Extraer la muestra con un volumen (500 µl) de cloroformo: alcohol isoamílico (24 : 1) mezclando por inversión aproximadamente 30 veces. En este paso no es conveniente vortexear ya que se pueden producir daños en el ADN.

5. Centrifugar a 5000 rpm durante 10 minutos a 4°C.

6. Transferir la fase acuosa a un nuevo tubo eppendorf.

7. Repetir los pasos 4 a 6.

8. Agregar un volumen (500 µl) de isopropanol. Colocar en hielo 10 minutos. En este punto del proceso se puede dejar la solución toda la noche en freezer -20°C para incrementar el rendimiento.

9. Centrifugar a 12000 rpm durante 10 minutos. En caso de no ver precipitado: Precipitar a -20°C toda la noche, y luego centrifugar a 12000 rpm durante 20 minutos a 4°C y resuspender con agua estéril.

10. En caso de ver precipitado tomarlo con un tip y colocarlo en un eppendorf conteniendo etanol 70% frío. Centrifugar 5 minutos a 12000 rpm.

11. Pasar el precipitado a un tubo limpio y dejar secar a temperatura ambiente o en estufa a 37°C.

12. Resuspender en 60 – 70 µl de agua MilliQ.

III.3.2. Extracción de ARN

La extracción del ARN de las muestras de *A. quebracho-blanco* se realizó mediante el Método de las sales de guanidino, adaptado a tejidos vegetales, para lo cual se utilizó el reactivo comercial Trizol (Invitrogen). Este reactivo contiene fenol e isotiocianato de guanidina, y permite separar el ARN de otras macromoléculas, en base a la solubilidad diferencial de las mismas. Este reactivo, permite también mantener la integridad del ARN durante la etapa de extracción, por inactivación de las ARNasas endógenas.

Al trabajar con ARN deben tomarse las máximas precauciones para evitar contaminaciones con ARNsas y la consecuente degradación del ARN. Por esta razón, en todo momento se trabajó con material estéril. Además, con el fin de obtener los mejores rendimientos, se trabajó con muestras frescas como material de partida. Las muestras se almacenaron a –80 ºC. Una vez realizada la extracción del ARN, el mismo se almacenó a –80 ºC, a fin de evitar su degradación.

III.3.2.1. Protocolo experimental

1. Se pesan 100 mg de material foliar previamente lavado con agua destilada estéril y se homogenizan en un tubo eppendorf con 1 ml de TriZOL.

2. Se centrifuga el tejido homogeneizado a 12000 xg por 10min a 4ºC.

3. Se transfiere la fase superior a un nuevo tubo y se incuba durante 5 min a temperatura ambiente.

4. Luego se adicionan 200 µl de cloroformo, se agita vigorosamente durante 15 min y se incuba de 2 a 3 min a temperatura ambiente.

5. Se centrifuga a 12000 xg durante 15 min a 4ºC, con lo que se obtienen tres fases bien diferenciadas:

   a. Fase Superior Acuosa: Contiene RNA total.

   b. Interfase proteica.

   c. Fase Inferior Orgánica: Contiene DNA.

6. La fase acuosa se transfiere a un nuevo tubo y se adicionan 500µl de alcohol isopropílico, agitando suavemente.

7. Se incuba 10 min a temperatura ambiente y luego se centrifuga a 12000 xg durante 10 min a 4ºC.

8. Se descarta el sobrenadante y se lava el pellet con 1 ml de etanol al 75%.

9. Se centrifuga a 7500 xg durante 5 min a 4ºC, se descarta el sobrenadante y se deja secar el pellet a temperatura ambiente.

10. El pellet se resuspende en 50 µl de agua MilliQ estéril libre de ARNsas.

III.3.3. Cuantificación de ácidos nucleicos

A fin de cuantificar el ADN y ARN proveniente de las muestras de *A. quebracho-blanco* se utilizó la medición de absorbancia a 260 ηm en espectrofotómetro, por ser una metodología precisa, rápida y económica. Dado que un valor de densidad óptica igual a 1

(DO =1), corresponde a 50 µg/ml de ADN de doble cadena y a 40 µg/ml de ARN, es posible, mediante un simple cálculo, estimar la concentración aproximada en cada muestra. La concentración de ADN se calcula en µg/µl con la fórmula:

$$\frac{A_{260} \text{ x factor de dilución x } 50}{1000}$$

Donde:

A_{260}: Absorbancia de la muestra a 260 nm

50: Factor que indica que una absorbancia de 1 corresponde a 50 µg/ml de ADN. En el caso del ARN, este factor es 40.

1000: Factor de conversión de ml a µl

Para evaluar la pureza del ADN y del ARN, se utiliza la relación A_{260}/ A_{280} (absorbancia de la muestra a 260nm/ absorbancia a 280 nm). Valores entre 1,8 a 2, denotan un grado óptimo de pureza de los ácidos nucleicos, pudiendo ser utilizado en reacciones de PCR. Si la relación es < que 1,8, esto indica la contaminación con compuestos fenólicos, proteínas, polisacáridos, etc.; lo que puede interferir con la reacción de amplificación posterior.

III.4. CONDICIONES DE AMPLIFICACIÓN MEDIANTE RAPD

Para la obtención de los marcadores RAPDs se emplearon 100 ng totales de cada muestra como templado en un termociclador Perkin – Elmer Amp PCR System 2400.

El programa de PCR, modificado de Williams *et al.* (1990) fue: un ciclo de 3 min at 94 º C, seguido por 40 ciclos de 1 min a 94 ºC, 1 min a 35 ºC y 1 min at 72 ºC, con una etapa de extensión de 7 min a 72 ºC. La enzima *Taq* polimerasa utilizada es producida en el Laboratorio de Biología Molecular – Univ. Nacional de San Luis (Manzur *et al.* 2006).

Las concentraciones utilizadas en la amplificación (Vf= 20 µl) fueron las siguientes:

- 0,25 mM de cada dNTP (dATP, dTTP, dCTP y dGTP);
- 1x Buffer *Taq* polimerasa;
- 5,625 mM de $MgCl_2$;

- 1,25 µM de primers OPA;
- 1,2 unidades de Taq polimerasa.

A fin de verificar la repetitividad de los patrones RAPDs obtenidos con cada *primer*, se repitieron las amplificaciones mediante RAPDs de algunas muestras de cada población, en un día diferente a la primer amplificación.

III.5. ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA

La agarosa es un polímero lineal formado por la repetición de unidades de β (1-3) Galactosil-α-(1-4)-(3, 6 anhidro) galactosa de elevada longitud, que forma una estructura rígida con poros, cuyo tamaño va a depender de la concentración de la agarosa. A continuación se detallan los distintos tipos de electroforesis en geles de agarosa realizados.

III.5.1. Control de integridad de ADN

La integridad del ADN extraído de cada muestra, se comprobó mediante corrida electroforética del ADN en un gel de agarosa al 1% en buffer TAE 1X, utilizando una cuba submarina horizontal bajo una diferencia de potencial de 5 V/cm. Para la visualización del ADN se realizó una tinción con Gel Red y se observó a través de un transiluminador de luz ultravioleta.

III.5.2. Control de integridad de ARN

Con el objeto de verificar la integridad del ARN total extraído, se prepararon geles de agarosa al 1% p/v en condiciones no desnaturalizantes. Si bien para el análisis de la calidad e integridad del ARN, es más apropiado el uso de geles desnaturalizantes, en este caso, las condiciones desnaturalizantes fueron aportadas por el buffer de siembra.

Luego de la cuantificación del ARN de cada muestra, se sembraron aproximadamente 4 µg de ARN en el gel de agarosa al 1% y la electroforesis se realizó a 80 V durante 30 min en buffer TAE 1X.

La presencia de bandas discretas (visualizadas utilizando un transiluminador-UV) correspondientes a los ARN ribosomales permite determinar que el ARN total extraído no sufrió degradación durante el proceso de extracción.

Preparación de las muestras: Cada una de las muestras de ARN analizadas se procesaron de la siguiente manera: en primer lugar se las mezcló con el Loading buffer y se las incubó en baño termostatizado a 65 °C durante 15 min. Una vez transcurrido este tiempo, fueron retiradas del baño y se las colocó inmediatamente sobre hielo a fin de evitar la reconstitución de la estructura secundaria del ARN. Finalmente se les agregó el colorante bromuro de etidio.

ARN (2 µg/µl)……. 2 µl
BrEt (1 mg/ml)……..5 µl
Loading buffer …….14 µl

III.5.3. Electroforesis de los productos RAPDs

Los fragmentos de ADN amplificados por PCR, fueron separados mediante electroforesis en geles de agarosa, en buffer TAE 1 X, utilizando cubas de electroforesis horizontal. La corrida electroforética se realizó a 60V, por 1 hora. El porcentaje de agarosa empleado en la elaboración de los geles fue del 2 % en buffer TAE 1 X. Para la visualización de los fragmentos amplificados se añadió al gel 0,05 µg/ml de Gel Red. Se sembraron 10 µl de cada producto de amplificación, previamente mezclado con 2 µl de loadding buffer. Se incluyó un patrón estándar (Ladder 100 bp, Productos Bio-Lógicos), el cual permitió discriminar los productos amplificados de acuerdo a su peso molecular, identificando las bandas homólogas, es decir aquellas del mismo peso molecular. Las bandas en los geles fueron visualizadas posteriormente en un transiluminador UV y fotografiadas con una cámara digital.

III.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS DE LOS PATRONES RAPDS

Para el análisis de los productos RAPDs se confeccionó una Matriz Básica de Datos (MBD), codificando con valor 1 la presencia y con 0 la ausencia de cada banda RAPD mediante el programa NTSYS 2.01e (Rohlf 1998).

III.6.1. Análisis de agrupamiento

El análisis de agrupamiento se realizó utilizando el programa NTSYS 2.01e (Rohlf 1998), donde a partir de la MBD se construyó la matriz de similitud entre todos los pares de individuos utilizando el Coeficiente de Asociación de Jaccard (***CAJ***). Este coeficiente está dado por la ecuación:

$$CAJ = a/(a + b + c)$$

donde a es el número de bandas presentes en ambos individuos (1,1), b es el número de bandas presentes en el individuo i (1,0) y c es el número de bandas presentes en el individuo j (0,1). En el CAJ, al igual que en el índice de Dice (Nei & Li 1979), no se considera a d, es decir, la ausencia de una misma banda en ambos individuos (0,0). Este hecho hace al CAJ muy apropiado al trabajar con marcadores dominantes como los RAPDs, dada la posibilidad de que los alelos nulos no sean homólogos (Harris 1999, Wong *et al.* 2001, Bussell *et al.* 2005; Laurentin 2009).

En el análisis de agrupamiento se utilizó ligamiento promedio UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic averages*), también en el programa NTSYS-PC 2.01e (Rohlf 1998).

Además se realizó el análisis de agrupamiento basado en la distancia genética de Nei (1972) entre poblaciones, utilizando el programa POPGENE (version 1.32) (Yeh *et al.* 1997).

III.6.2. Análisis de coordenadas principales

El Análisis de Coordenadas Principales realizado usando el programa GenAlex versión 6.1. (Peakall & Smouse 2006), permitió evaluar las similitudes entre los ejemplares de *A. quebracho-blanco* de los distintos sitios experimentales.

El fin de este análisis es representar un conjunto de individuos, objetos o subpoblaciones pertenecientes a una población, respecto a un conjunto de variables que pueden ser cuantitativas, cualitativas o una combinación de ambas. La representación de los objetos se realiza en un espacio de dimensión reducida, normalmente 2 ó 3. El propósito general es reducir la dimensión de los datos con el fin de interpretar las similitudes y las disimilitudes entre los individuos de manera simple.

III.6.3. Análisis de la estructura genética poblacional

A partir de la MBD se estimaron los valores medios de los descriptores de la estructura genética para el total de individuos analizados (***N***). De este modo, utilizando el programa POPGENE versión 1.32, se estimó el número de alelos observados ***(na)***; el número efectivo de alelos por locus ***(ne)***; la diversidad genética de Nei (1973) (***h)*** y el porcentaje de loci polimórficos para cada sitio de estudio ***(P)***.

A fin de estudiar la partición de la diversidad genética a nivel intra e interpoblacional, se utilizaron dos herramientas: el índice de Shannon-Weaver (1949), calculado manualmente, y el Análisis de la Varianza Molecular (AMOVA) utilizando el programa GenAlex versión 6.1. (Excoffier *et al*. 1992; Peakall & Smouse 2006).

III.6.3.1. Índice de Shannon-Weaver

El índice de Shannon-Weaver se calculó manualmente, según la siguiente fórmula:

$$H = -\sum_{i=1}^{k} Pi \ln Pi$$

donde *Pi* es la frecuencia de presencia o ausencia de cada banda RAPD.

Se determinó la diversidad promedio por población (***Ho***), calculando el promedio de ***H*** para todos los *primers* en cada población.

La diversidad promedio poblacional ***Hpop*** se calculó según la siguiente fórmula:

$$\boldsymbol{Hpop = \sum Ho/n}$$

donde ***n*** es el número de poblaciones.

La diversidad de la especie ***Hsp*** fue calculada utilizando la misma fórmula de ***Ho***, sin tener en cuenta las poblaciones, es decir, es calculada para la totalidad de las poblaciones en conjunto. Los componentes intrapoblacionales e interpoblacionales de la diversidad genética dados por:

Diversidad genética intrapoblacional= ***Hpop/Hsp***

Diversidad genética interpoblacional= ***(Hsp – Hpop)/Hsp***

A fin de comparar los valores de Hpop/Hsp y (Hsp –Hpop)/Hsp, se utilizó Mann-Whitney W-test para comparar las "medianas entre dos muestras", con una probabilidad $p<0,05$ y un 95% de nivel de confianza. Este test fue realizando en el programa Statgraphics Centurion XVI (2009).

III.6.3.2. Análisis de la Varianza Molecular

AMOVA (Excoffier *et al*. 1992) es un método que sirve para estudiar la variación molecular dentro de una especie. Se basa en un modelo jerárquico, que permite estudiar la partición de la variación total en sus componentes intra e interpoblacional, no suponiendo una distribución normal. Mediante el programa Genalex 6.1, se calcularon los estadísticos Φ del AMOVA (análogos a los estadísticos *F* del ANOVA) y la significancia de cada análisis se evaluó mediante 999 permutaciones. Se utilizó AMOVA para analizar la proporción de la varianza molecular en los distintos niveles jerárquicos. Además, para determinar el nivel de diferenciación a distintas escalas espaciales, se realizaron también AMOVAs dentro de cada región.

III.6.3.3. Determinación de G_{ST} y Flujo génico (Nm)

Entre los métodos que permiten estimar la diferenciación y la estructura genética, se encuentran aquellos que se basan en estimar la proporción de variación genética dentro y entre las poblaciones, generalmente empleando el estadístico Fst o sus análogos, como es el caso del Coeficiente de diferenciación génica (G_{ST}). Estos estimadores tienen en principio la ventaja adicional de brindar información sobre el flujo génico, es decir, el número efectivo de migrantes por generación, o *Nm* presentes en una población o región. En este trabajo, se estimó la proporción de variación genética distribuida entre las poblaciones mediante el Coeficiente de diferenciación génica (G_{ST}) usando POPGENE versión 1.32.

Las estimaciones de flujo genético se basan en modelos teóricos de estructura espacial de las poblaciones, como son el modelo de isla, el modelo paso a paso (stepping stone) o el modelo de aislamiento por distancia (continuo). Sin embargo, la estimación de este parámetro se realiza en forma indirecta a partir de estos modelos a partir de estadísticos como F_{ST} o G_{ST} en el caso de los RAPD, o bien por el método de alelos privativos.

En este estudio se utilizó el primer método para obtener Nm a partir de G_{ST}, el cual se puede definir como el número absoluto de individuos intercambiados entre poblaciones por generación. El programa POPGENE versión 1.32., calcula el Nm para organismos haploides según la ecuación (McDermott & McDonald, 1993):

$$\mathbf{Nm = 0.5\ (1 - G_{ST})\ /\ G_{ST}}$$

donde

N: tamaño de la población

m: tasa de migración

$\mathbf{G_{ST}}$: Coeficiente de diferenciación génica.

En el caso de organismos diploides, el flujo génico se calcula utilizando el estimador G_{ST} (Nei 1973) definido como:

$$G_{ST} \approx 1/ (4 Nm + 1)$$

Este modelo asume que las poblaciones están en equilibrio entre deriva génica y flujo génico, y que las 'islas' intercambian migrantes entre sí con igual probabilidad a una tasa constante. Es importante verificar que este supuesto se cumpla en el sistema de poblaciones bajo estudio, a fin de poder calcular Nm. Si el supuesto de equilibrio deriva-flujo génico no se cumple, entonces F_{ST} o su análogo G_{ST}, no equivale a 1/(4Nm+1). Para verificar este supuesto debe realizarse un test de Mantel para verificar la correlación entre diferenciación genética entre pares de poblaciones y distancia geográfica.

Se compararon los valores del Coeficiente de diferenciación génica (G_{ST}), utilizando el test de Wilcoxon, utilizando el programa GraphPad Prism 5, con una probabilidad $p< 0,05$ y un 95% de nivel de confianza.

III.6.3.4. Test de Mantel

La diferenciación genética interpoblacional en marcadores moleculares puede tener su origen en limitaciones al flujo génico entre poblaciones, las cuales pueden ser debidas a su vez a un aislamiento reproductivo originado en gran parte por la distancia geográfica. La prueba de Mantel (Mantel 1967) es una de las herramientas estadísticas más utilizadas para evaluar la significancia estadística de la dependencia entre distancias genéticas y geográficas. Esta evalúa, vía procedimientos de permutación aleatoria, si la relación lineal entre las distancias geográficas y genéticas es significativa, lo cual se considera indicativo de la presencia de estructura genética poblacional. Las distancias genéticas y geográficas se pueden expresar matricialmente ya que corresponden a pares de individuos o pares de grupos de individuos identificados a priori.

El estadístico de la prueba de Mantel es el mismo coeficiente de correlación lineal de Pearson:

$$Z = r_{XY} = \frac{Cov(X,Y)}{\sqrt{Var(X).Var(Y)}}$$

donde el numerador representa la covarianza entre las matrices X e Y (suma de productos cruzados entre los elementos de la matriz X y la matriz Y) y el denominador la raiz cuadrada del producto de la varianza (suma de cuadrados) total en cada matriz.

La prueba de permutación de Mantel, deja inalterada una de las matrices y permuta filas (y columnas) de la otra matriz de manera de desfigurar, si existiera, la correlación entre ambas. En la práctica, el número de permutaciones posibles es tan elevado que sólo se utiliza una muestra al azar de las posibles permutaciones (en nuestro caso 999).

Luego de realizar numerosas permutaciones y calcular en cada escenario la correlación, obtiene la distribución del estadístico bajo la hipótesis nula (falta de correlación) y posicionando al valor de correlación encontrado en las matrices inalteradas estima la significancia estadística o valor p (probabilidad de obtener valores mayores o iguales al valor absoluto del estadístico observado). Cuando la correlación entre la matriz de distancias genéticas y la matriz de distancias geográficas es estadísticamente significativa, se concluye que existe estructura espacial lineal.

En este trabajo de Tesis, la matriz de distancias genéticas obtenida mediante la fórmula de Nei (1972), fue comparada con la matriz de distancias geográficas empleando el test de Mantel (1967) utilizando el programa GenAlex versión 6.1.

III.7. CARACTERIZACIÓN POR SECUENCIACIÓN DE BANDAS OBTENIDAS COMO MARCADORES RAPDS

III.7.1. Selección y purificación de productos RAPDs de interés

Para caracterizar algunos de los marcadores RAPDs generados en el análisis de diversidad genética, se seleccionaron bandas que, por su presencia constante o diferencial en un grupo poblacional, resultaron de interés como marcadores diferenciales. Por comparación en el banco de genes, se inferirá si las secuencias obtenidas corresponden a regiones repetitivas del genoma o a regiones codificantes y, en este último caso, se identifica la presencia de ciertos genes.

Tras la selección de algunas bandas RAPDs de interés, se las purificó directamente desde un gel de agarosa al 1% p/v. Para ello, cada banda fue cortada del gel con un bisturí estéril mientras éste se visualizaba con luz ultravioleta en el transiluminador.

En la etapa de purificación de cada banda, se utilizó el sistema de purificación GFX™ *PCR – DNA and Gel Band Purification Kit* (Amersham Biosciences), según el protocolo provisto por el comerciante. Este sistema permite realizar una purificación directa a partir del producto de PCR, mediante el uso de minicolumnas.

De este modo, se obtuvo un producto de amplificación libre de contaminantes del medio de reacción, como *primers*, polimerasa y sales, que pueden interferir con la reacción de ligación al plásmido durante el subclonado.

III.7.2. Subclonado de los productos de PCR

Los fragmentos amplificados y purificados fueron subclonados mediante las siguientes etapas:

III.7.2.1. Ligación del fragmento al plásmido pGem-T-Easy

El plásmido pGem-T-Easy (Figura III.14) seleccionado para realizar el subclonado permite utilizar el producto de amplificación en forma directa, aprovechando la propiedad de la enzima *Taq* polimerasa de dejar en los extremos del producto una adenina (A) tras la amplificación. Este vector contiene en su sitio de clonado una timina (T) que facilita el apareamiento de las bases y la ligación plásmido-vector. Además posee un gen de resistencia para ampicilina, y un gen que codifica la enzima β-galactosidasa solapado al sitio de clonado, que permite la selección de las bacterias transformadas con el plásmido que contiene el inserto.

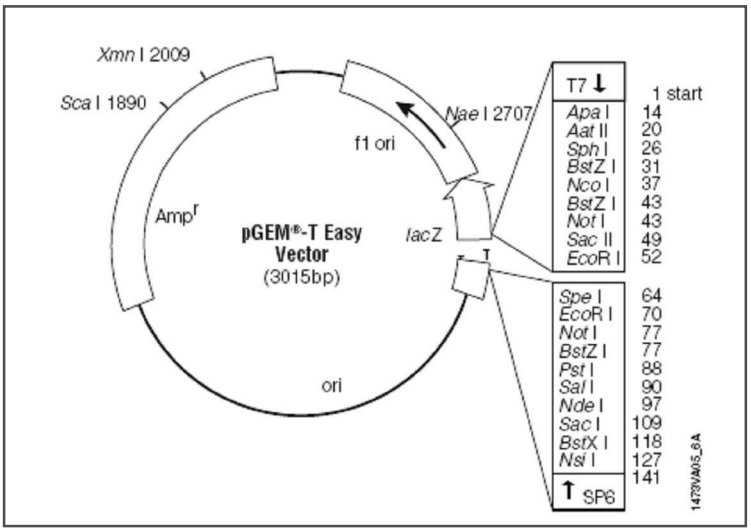


Figura III.14. Vector de clonación pGem-T Easy. Mapa circular donde se muestran los elementos de referencia del vector, incluyendo el sitio de clonado múltiple con las enzimas de restricción para las cuales tiene secuencias diana (rectángulos en el lado derecho).

Este vector es un plásmido de alto número de copias que se comercializa en forma linealizada después de haber sido digerido enzimáticamente mediante la endonucleasa de restricción EcoRV. Además, el sitio de clonado se encuentra flanqueado por un lugar de clonación múltiple que contiene dianas únicas para algunas endonucleasas de restricción. En los extremos del mismo, aparecen cuatro secuencias promotoras diferentes (para los *primers* SP6 y T7.

Para ligar al vector pGem-T Easy, los productos del PCR purificados desde el gel de agarosa al 1% p/v, se utilizó el siguiente protocolo: la mezcla de ligación se llevó a cabo en un volumen final de 10 µL, con 5 µL de Buffer de ligación 2X, 0,5 µL de vector de clonamiento pGem-T Easy, 3,5 µL de inserto y 1 µL de enzima T4-ADN ligasa. La mezcla se dejó ligando a 4°C durante 12hs. El producto de esta ligación se utilizó para transformar células de *Escherichia coli DH5α* competentes.

III.7.2.2. Preparación de bacterias competentes

La expansión del plásmido se llevó a cabo en *E. coli DH5α*, previa preparación de bacterias competentes mediante la técnica de $CaCl_2$.

Se sembraron 10 µl de un stock de bacterias en una placa con medio LB (Luria – Bertani)-agar (triptona ácida 10 g/l, extracto de levadura 5 g/l, NaCl 10 g/l y agar 1,5 g/l cada 100 ml de medio). La placa se incubó O.N. a 37°C, y de ella se repicó una colonia aislada en 5ml de medio LB que se creció en estufa O.N. a 37°C con agitación constante. Este cultivo se inoculó en 100 ml de medio LB a 37°C con agitación y se dejó crecer hasta una densidad óptica de 0,48 – 0,50 O.D. medida a 580nm. Una vez alcanzada la densidad deseada se procede a centrifugar el cultivo en centrífuga refrigerada a 4°C durante 10 min a 1000 rpm para cosechar las bacterias.

Para la preparación de bacterias competentes, tratamiento que permeabiliza la membrana para que acepte el vector, las células fueron resuspendidas en 3 ml de $CaCl_2$ 50 mM y se centrifugaron a 10000 rpm a 4°C, por 5 min. El pellet se resuspendió en 1,6 ml de $CaCl_2$ 50 mM obteniéndose de esta forma bacterias competentes. Todas las etapas se realizaron sobre hielo y en condiciones de esterilidad.

III.7.2.3. Transformación de bacterias competentes

El método elegido para la transformación es el de "Shock térmico", para lo cual, 50 µl de bacterias competentes y 5 µl del plásmido conteniendo el inserto se incubaron 10 min sobre hielo, y luego se lo incubó a 42°C por 2 min. Este cambio brusco de temperatura permite la entrada del ADN plasmídico a las células.

Posteriormente, se adicionaron 500 µl de medio LB y se incubó en estufa a 37°C donde permanecieron por 45 min para reestablecer la membrana celular, seguido de centrifugación a 5000 rpm durante 5 min. El pellet se sembró en una placa de medio LB – agar que contiene 20 µl de ampicilina 50 mg/ml, 50 µl de IPTG (isopropil-β-D-tio-galactósido) 0,1M y 100 µl de X-Gal 2%, la placa se incubó O.N. a 37°C.

Las bacterias transformadas con el plásmido son seleccionadas, ya que el mismo contiene el gen de resistencia a ampicilina. La selección de las bacterias recombinantes, es decir, las portadoras del inserto, se hizo por el método de colonias blancas y azules. La presencia de IPTG y X-Gal permite seleccionar aquellas bacterias que contienen el plásmido portador del inserto. Aquellas bacterias que no contienen el inserto, no tendrán interrumpido el gen β-gal, por lo tanto serán capaces de degradar el sustrato X-Gal, generando colonias azules. En la placa deberían diferenciarse colonias azules (transformadas pero carentes de inserto), y colonias blancas portadoras del vector con el inserto.

III.7.3. Minipreparación de ADN plasmídico

El ADN de un plásmido recombinante presente en una bacteria se aísla por un método rápido y sencillo ("miniprep") que consiste en lisis bacteriana, precipitación de proteínas y ADN genómico, y finalmente precipitación del ADN plasmídico.

El método empleado para la obtención del plásmido se denomina de "lisis alcalina": se basa en la lisis celular y desnaturalización del ADN mediante NaOH y SDS, y la posterior renaturalización en condiciones en las que sólo el ADN plasmídico recupera su estructura nativa, gracias a su pequeño tamaño y su naturaleza circular y superenrollada.

Al neutralizar el medio y añadir una alta concentración de acetato de potasio, se produce la precipitación de gran parte de las proteínas debido al tratamiento previo con SDS y a la alta concentración de sales. También precipita el ADN cromosómico, probablemente porque se producen reasociaciones al azar entre las diferentes regiones de este ADN y así se forman agregados insolubles. Por el contrario, el ADN plasmídico se renaturaliza correctamente y queda soluble, en el sobrenadante. La purificación del plásmido se completa después por precipitación con etanol.

La concentración de ADN obtenido se determina mediante la medida de la absorbancia a una longitud de onda de 260 nm, sabiendo que un valor de densidad óptica igual a 1 (DO =1), corresponde a 50 µg/ml de ADN de doble cadena.

Para expandir las bacterias transformadas, es necesario seleccionar algunas colonias blancas y repicarlas en un cultivo en 5 ml de medio líquido estéril con 5 µl de ampicilina. Se siembra un clon por tubo y se crece O.N. a 37°C con agitación constante. A partir del cultivo, se realiza la extracción del ADN plasmídico de interés por el método de "Lisis Alcalina" (Ausubel *et al.* 1999), utilizando el siguiente protocolo:

1. Se verificó el crecimiento del cultivo por turbidez y se tomaron 1,5 ml de medio y se centrifugó a 5.000 rpm durante 5 min.
2. El pellet de células obtenido se resuspendió en 100 µl de ***Solución I***. Se agitó vigorosamente con vortex.
3. Se agregaron 200 µl de ***Solución II*** para lisar las células. Incubar 5 min a temperatura ambiente.
4. Se agregaron 150 µl de ***Solución III*** fría para precipitar el ADN genómico. Mezclar por inversión e incubar 10 min en hielo.
5. Se centrifugó a 12.000 rpm durante 15 min a 4 °C.
6. Se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo con 3 µl de ARNasa (10 mg/ml) y se incubó durante 4 horas a 37 °C. Este tratamiento es fundamental para eliminar el ARN que pueda haber quedado en el medio.
7. Se extrajeron las proteínas con 450 µl de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1). Se agitó suavemente y centrifugó 5 min a 12.000 rpm a temperatura ambiente para separar las fases.
8. Se tomó la fase acuosa superior y se precipitó el ADN plasmídico mediante el agregado de 600 µl de isopropanol. Se incubó al menos 30 min a temperatura ambiente.
9. Luego se centrifugó durante 15 min a 12.000 rpm y se descartó el sobrenadante.
10. Se lavó el pellet de ADN plasmídico con 500 µl de Etanol 70 %.
11. Se centrifugó 15 min a 12.000 rpm y se descartó el sobrenadante.

12. Por último se secó el pellet a temperatura ambiente y se resuspendió en 40 µl de Buffer TE (Tris-HCl 10mM, EDTA 1 mM).

Solución I	***Solución II:***	***Solución III***
pH:8		***pH:5,2***
Tris-HCl ……..25 mM	NaOH ……..0,2 N	AcK.……..……..3 M
Glucosa……50 mM	SDS..……1%	

III.7.4. Verificación de la presencia del inserto

Para verificar la presencia del inserto en el plásmido, se amplificó por PCR el fragmento clonado con los *primers* SP6 y T7, que permiten la amplificación del inserto ya que son complementarios a los sitios adyacentes al sitio de clonado. Cabe destacar que los productos de amplificación con los *primers* SP6 y T7 a partir de plásmidos recombinantes se ven incrementados en su tamaño por 182pb.

Se utilizó el siguiente protocolo:

ADN	100 ng
Buffer 10x	2 µl
dNTPs (10mM)	0,5 µl
MgCl2 (25mM)	2,5 µl
SP6 primer 1mM	0,5 µl
T7 primer 1mM	0,5 µl
Taq polimerasa (0,8 U/ µl)	0,5 µl
H2O milliQ	c. n. para Vf= 20 µl

El programa de PCR a seguir, presenta un ciclo de 5 min at 94 º C, seguido por 30 ciclos de 1 min a 94 ºC, 30 s a 54 ºC y 1 min a 72 ºC, con una etapa de extensión de 7 min a 72 ºC.

Así mismo se verificó la presencia de los insertos mediante digestión con la enzima de restricción *EcoRI* del plásmido recombinante.

III.7.5. Secuenciación

Los productos RAPDs a secuenciar se enviaron al Servicio Interno de Genotipificación y Secuenciación de ADN (SIGYSA), Instituto de Biotecnología, CNIA - INTA Castelar. La secuenciación de los productos seleccionados se llevó a cabo utilizando los *primers* del promotor T7 y del promotor SP6 que flanquean la zona de inserción del plásmido pGem-T Easy (Figura III.15).

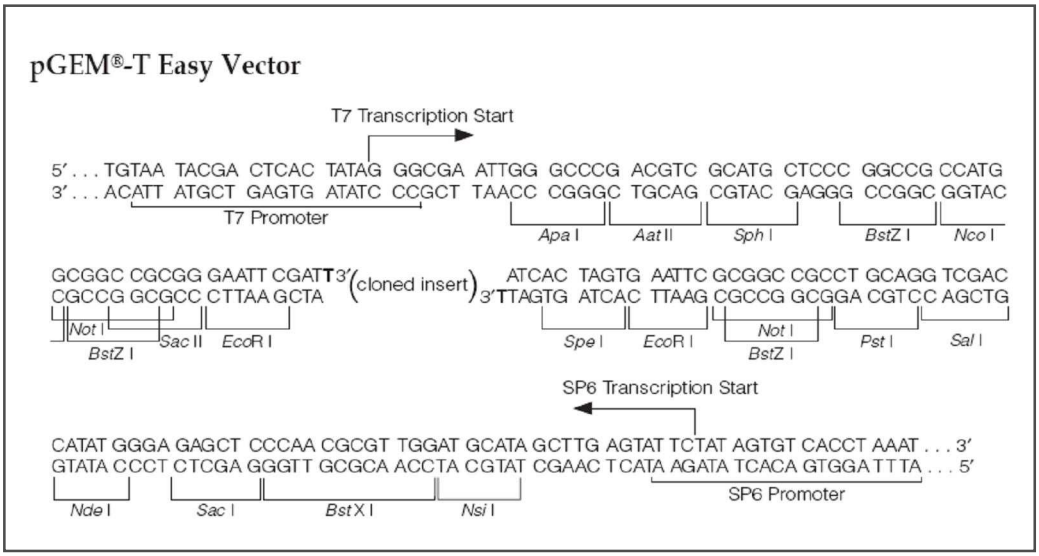


Figura III.15. Sitio de clonado múltiple en el vector pGem-T Easy. Se muestran los sitios donde hibridan los primers SP6 y T7. Se muestran también los sitios diana a distintas enzimas de restricción.

III.7.5.1. Confirmación de secuencias

Una vez secuenciado cada inserto con los *primers* T7 y SP6 se realizan algunos pasos previos a la obtención de la secuencia completa del inserto correspondiente. El primer paso consiste en eliminar las secuencias pertenecientes al vector pGem-T Easy, para lo cual se utilizó la herramienta *VecScreen* de BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)- NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/VecScreen/VecScreen.html). En el segundo paso, las secuencias obtenidas con el *primer* T7 y con el *primer* SP6 son alineadas en BLAST 2 sequences (bl2seq - http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi). Esto permite obtener una secuencia de mayor tamaño que contiene un sector de alineamiento perfecto por

complementariedad de ambas secuencias. De este modo se obtuvo la secuencia completa de cada inserto. La Figura III.16 muestra un esquema representativo de las etapas seguidas en este proceso.

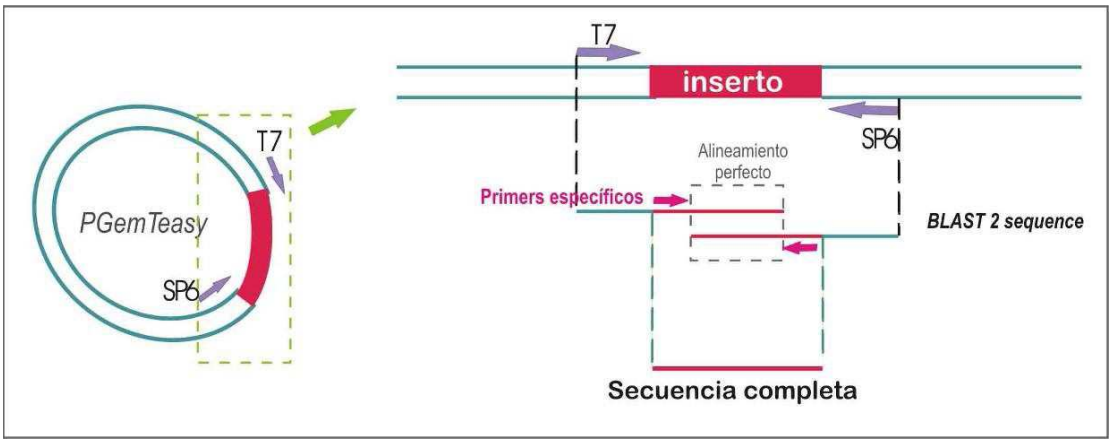


Figura III.16. Esquema representativo de la obtención de la secuencia completa del inserto a través de secuenciación con *primers* T7 y SP6 en pGem-T Easy. Las flechas indican los *primers* utilizados, en violeta los de los promotores SP6 y T7; y en fucsia los *primers* específicos para cada secuencia.

III.7.6. Diseño de *primers* específicos

Conocida la secuencia del inserto se diseñaron los *primers* específicos correspondientes, complementarios a la secuencia completa de cada inserto como se muestra en la Figura III.17. Para el diseño de los *primers* se utilizó la herramienta Primer-BLAST de BLAST versión 2.2.18.

III.7.7. Alineamiento de secuencias

Un alineamiento de secuencias es una forma de representar y comparar dos o más secuencias de ADN, ARN o de estructuras primarias proteicas para resaltar las zonas de similitud, que podrían indicar relaciones funcionales o evolutivas entre los genes o proteínas consultados.

III.7.7.1. Análisis de homología con secuencias conocidas

Las secuencias obtenidas fueron sometidas a comparación con secuencias reportadas en el Banco de genes (Genbank) del Centro Nacional para la Información en Biotecnología (NCBI – National Center of Biotechnology Information) http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/, empleando el programa BLAST de dicho sitio.

BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) es un programa informático de alineamiento local de secuencias, ya sea de ADN o de proteínas, que puede comparar una secuencia problema contra secuencias que se encuentren en una base de datos. De esta forma, permite encontrar las secuencias de la base de datos con mayor homología a la secuencia problema. Existen distintos tipos de programas BLAST para el análisis de secuencias tanto de nucleótidos (Blastn, BlastX, TBlastX) como de proteínas (Blastp, PSI-Blast, PHI-Blast, TBlastn, etc).

La secuencia nucleotídica fue traducida con el programa Translate (EXPASY - http://web.expasy.org/translate/), y comparada con la Base de Datos de proteínas (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/seq/BlastGen/BlastGen.cgi?taxid=3702), de una especie modelo en estudios genéticos en plantas como *A. thaliana*.

Además, se buscaron dominios conservados en la secuencia de aminoácidos de las secuencias estudiadas utilizando la herramienta *Conserved Domains* en BLAST (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi).

III.7.7.2. Análisis de alineamiento múltiple

El alineamiento múltiple de secuencias es una extensión del alineamiento de pares de secuencias, que incorpora más de dos secuencias al mismo tiempo. Los alineamientos múltiples aportan importante información a nivel estructural y funcional. Son utilizados, a menudo, en la identificación de regiones conservadas en un grupo de secuencias hipotéticamente relacionadas evolutivamente. Así como en el establecimiento de relaciones evolutivas mediante la construcción de árboles filogenéticos.

A fin de analizar la proximidad genética de las secuencias obtenidas, se compararon por alineamiento múltiple la secuencia proteica de cada uno de los marcadores RAPDs seleccionados con secuencias homólogas de *A. thaliana* obtenidas previamente, utilizando el programa *CLUSTAL-W* (http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html.

III.8. RT-PCR

La expresión diferencial de genes es una de las formas de regulación básica que utilizan las células para expresar en forma, tiempo y espacio dependiente, las proteínas requeridas para una determinada condición ambiental o del desarrollo de la célula.

Para analizar la expresión de genes en una determinada circunstancia, se requiere analizar la presencia de los ARNm, los cuales representan el pool de proteínas que se están expresando en esas condiciones. Una de las formas más sencillas de analizar la regulación de la expresión de proteínas es a través de RT-PCR (Figura III.17). Se trata de una técnica utilizada en estudios genéticos que permite la detección y cuantificación de ARNm. Es un método muy específico que demuestra si un determinado gen está siendo expresado en una determinada muestra o no. Por otra parte, además de identificar un gen, esta técnica permite estimar semicuantitativamente la concentración de RNAm en una muestra. Para ello, es necesario utilizar una secuencia estándar como control, perteneciente a un gen constitutivo (por ejemplo GAPDH), que coamplifica con el producto a cuantificar. La diferencia de la intensidad de las bandas en un gel de agarosa permite evidenciar de manera semicuantitativa cuanto se expresa el gen de interés en comparación con el control.

Etapas de la RT-PCR

En la etapa de *Transcripción reversa*, el ARNm es copiado a ADNc, el cual se utilizará para realizar la amplificación específica de la síntesis de *TDC, STR* y *SGD*. Se partió del ARN obtenido a partir de muestras foliares de los sitios de estudio BV y C, y se utilizó la enzima M-MLV RT (*Moloney Murine Leucemia Virus Reverse Transcriptase*).

En la etapa de PCR, donde se produce la síntesis de la segunda hebra del ADNc y su amplificación, se utilizó la enzima GoTaq® (Promega).

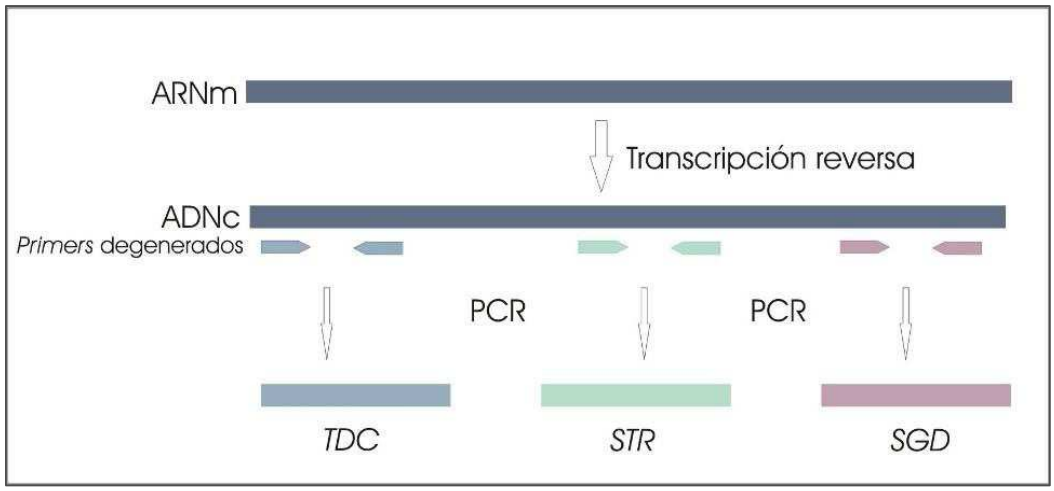


Figura III.17. *RT- PCR.* Transcripción reversa que utiliza como templado el ARNm para dar lugar al ADNc. Amplificación de los genes codificantes para *TDC, STR* y *SGD* mediante *primers* degenerados.

A pesar de las ventajas y utilidad de la técnica de RT-PCR, hay un gran número de variables que pueden interferir con la precisión y la fiabilidad de la misma. Entre ellas se encuentran, la cantidad e integridad del ARN utilizado como muestra inicial, la eficiencia de la síntesis de ADNc, y las diferencias en el nivel de transcriptos presente en las células o los tejidos analizados. La interferencia de estas variables puede ser en gran medida corregida mediante la 'normalización' de los niveles de ARNm entre las muestras. Esta normalización generalmente se realiza mediante el uso de un 'gen de referencia interno', que presente un nivel constante de expresión en el tejido elegido. Algunos genes de referencia utilizados como control son los genes de β-actina, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), ARN ribosomal 18S y α-tubulina. En nuestro trabajo hemos seleccionado el gen de GAPDH como control interno en la síntesis de ADNc, el cual será amplificado en *A. quebracho-blanco* utilizando *primers* degenerados.

La metodología de RT-PCR semicuantitativa, permite evaluar la variación en el nivel de expresión de genes bajo distintas condiciones ambientales. En este estudio, se seleccionaron ejemplares de cada uno de los sitios experimentales, a fin de evaluar la variación interpoblacional en el nivel de expresión de TDC, STR y SGD.

III.8.1. Selección de *primers* para la amplificación de TDC, STR y SGD

Al desconocerse las secuencias de los genes de TDC, STR y SGD de *A. quebracho-blanco*, los *primers* se seleccionaron de la bibliografía publicada para otras especies como *C. roseus* y *R. serpentina* (Geerlings *et al*. 2000; Yamazaki *et al*. 2003). Se emplearon de este modo, *primers* degenerados, que poseen opciones de bases para alguno de los codones de la secuencia.

Dado que el código genético es degenerado, el uso de los codones para un aminoácido varía entre especies, siendo un determinado triplete más común en una determinada especie que en otra. Estos *primers* se utilizan para amplificar genes de secuencia desconocida a partir de secuencias conocidas de especies relacionadas.

La Tabla III.2 muestra los *primers* degenerados a utilizar en la amplificación de SGD, STR y TDC en *A. quebracho-blanco.*

Tabla III.2. *Primers* degenerados para *SGD, STR* y *TDC*.

SGD forward: GT**N** AC**N** **H**TI TT**Y** CA**Y** TGG GA
SGD reverse: GAC CA**N** GC**R** **W**A**R** **W**A**I** CC**Y** TT
STR forward : TA**Y** TTC AC**I** **KMY** **IYI** AGC **W**C
STR reverse : AC**R** AA**I** GA**I** **YYR** T**Y**T **KIR** CT
TDC forward : C**K**G A**R**G AAT T**Y**C CGA AA
***TDC reverse*:** AC**S** **M**A**Y** **Y**CT TCG AAC AT

Donde:
N: A / C / G / T,
H : A /C / T,
Y : C / T,
R : A / G,
W : A / T,
I:inosina,
K : G / T
M : A / C

Como se desprende del análisis de las secuencias, cada *primer* en realidad es una mezcla de varias secuencias, de las cuales se espera que unas pocas tengan mayor afinidad por la secuencia a amplificar.

III.8.2. RT-PCR de *Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH)*

A fin de poner a punto la amplificación de un gen que pueda ser utilizado como control interno para la reacción de Transcripción Reversa de ARN seguida de PCR (RT-PCR), se amplificó el gen de GAPDH a partir de algunas muestras de ARN.

La amplificación del mismo se realizó utilizando *primers* degenerados diseñados a partir de dos regiones conservadas de GAPDH en alfalfa (Schiene *et al.* 2004) y en tabaco (Plas *et al.* 2002). La secuencia de estos *primers* degenerados para GAPDH es la siguiente:

***GAPDH-f*:** (5'-AWTARGATCGGAATYAACGG-3')

GAPDH-r: (5'-GTAACCCCAYTCRTTGTCRTA-3')

Para la reacción de Transcripción Reversa (RT) de GAPDH se partió de 6 ug de ARN obtenido a partir de dos muestras de prueba (P1 y P2) para un volumen final de reacción de 20 µl. Esta reacción se llevó a cabo utilizando los *primers:* GAPDH reverse + STR reverse (0,5 µM de cada uno) o los *primers* GAPDH forward y reverse (0,5 µM de cada uno). Se adicionaron también los siguientes reactivos: 4 µl de Buffer RT, 1 µl de transcriptasa reversa (RT) y 0,05 mM de dNTPs.

En cada reacción de PCR se utilizaron: 2 µl de cDNA (reacción de RT), *primers* GAPDH forward y reverse (0,5 µM de cada uno), 0,04 mM de dNTPs, 1x de Buffer GoTaq® que incluye 1,5 mM de $MgCl_2$ (Promega), $MgCl_2$ adicional (5 mM), 1 U de GoTaq® (Promega) y H_2O (cantidad necesaria para llevar a Vf= 20 µl).

Las condiciones de RT- PCR, modificado de Plas *et al.* (2002) y de Schiene *et al.* (2004) fueron las siguientes:

Etapa RT: 10 min a 70 °C, 60 min a 42 °C, seguido por 5 min a 95 °C.

Etapa PCR: un ciclo de 5 min a 94 ºC, seguido por 30 ciclos de 30 seg a 94 ºC, 30 seg a 48.5 °C y 30 seg a 72 ºC, con una etapa de extensión de 7 min a 72 ºC.

III.8.3. RT-PCR de *Triptofano decarboxilasa (TDC)*

Para la reacción de Transcripción Reversa (RT) de TDC se partió de 6 ug de ARN para un volumen final de reacción de 20 µl utilizando 0,5 µM del *primer* TDC reverse, 4 µl de Buffer RT, 1 µl de M-MLV RT y 0,05 mM de dNTPs.

En cada reacción de PCR se utilizaron: 2 µl de cDNA (reacción de RT), 1x de Buffer GoTaq® que incluye 1,5 mM de $MgCl_2$ (Promega), 1 U de GoTaq® (Promega) y H_2O (cantidad necesaria para llevar a Vf= 20 µl). A fin de poner a punto la amplificación de TDC se probaron distintas temperaturas de 'annealing' de los *primers* TDC forward y reverse en la etapa de PCR, así como distintas concentraciones de dNTPs y $MgCl_2$.

Las condiciones de RT- PCR, modificado de Yamazaki *et al.* (2003) fueron las siguientes:

Etapa RT: 10 min a 70 °C, 60 min a 42 °C, seguido por 5 min a 95 °C.

Etapa PCR: un ciclo de 5 min a 94 º C, seguido por 40 ciclos de 1 min a 94 ºC, 1 min a 42°C y 2 min a 72 ºC, con una etapa de extensión de10 min a 72 ºC.

III.8.4. RT-PCR de *Estrictosidina sintasa (STR)*

Para la reacción de Transcripción Reversa (RT) de STR se partió de 6 ug de ARN para un volumen final de reacción de 20 µl utilizando los *primers* GAPDH reverse + STR reverse (0,5 µM de cada uno), 4 µl de Buffer RT, 1 µl de M-MLV RT y 0,05 mM de dNTPs.

En cada reacción de PCR se utilizaron: 2 µl de cDNA (reacción de RT), 1x de Buffer GoTaq® que incluye 1,5 mM de $MgCl_2$ (Promega), 1 U de GoTaq® (Promega) y H_2O (cantidad necesaria para llevar a Vf= 20 µl).

A fin de poner a punto la amplificación de STR se probaron distintas condiciones de *primers* STR forward y reverse, dNTPs y $MgCl_2$.

Las condiciones de RT- PCR, modificado de Yamazaki *et al.* (2003) fueron las siguientes:

Etapa RT: 10 min a 70 °C, 60 min a 42 °C, seguido por 5 min a 95 °C. ***Etapa PCR:*** un ciclo de 3 min a 94 ºC, seguido por 30 ciclos de 1 min a 94 ºC, 1 min a 42°C y 2 min a 72 ºC, con una etapa de extensión de10 min a 72 ºC.

III.8.5. RT-PCR de *Estrictosidina β-D-glucosidasa (SGD)*

Para la reacción de Transcripción Reversa (RT) de SGD se partió de 6 ug de ARN para un volumen final de reacción de 20 µl utilizando los *primers* GAPDH reverse + SGD reverse (0,5 µM de cada uno), 4 µl de Buffer RT, 1 µl de M-MLV RT y 0,05 mM de dNTPs.

En cada reacción de PCR se utilizaron: 2 µl de cDNA (reacción de RT), 1x de Buffer GoTaq® que incluye 1,5 mM de $MgCl_2$ (Promega), 1 U de GoTaq® (Promega) y H_2O (cantidad necesaria para llevar a Vf= 20 µl). A fin de poner a punto la amplificación de SGD se probaron distintas condiciones de *primers* STR forward y reverse, dNTPs y $MgCl_2$.

Las condiciones de RT- PCR, modificado de Geerlings *et al.* (2000) fueron las siguientes:

Etapa RT: 10 min a 70 °C, 60 min a 42 °C, seguido por 5 min a 95 °C.

Etapa PCR: un ciclo de 5 min a 94 º C, seguido por 40 ciclos de 1 min a 94 ºC, 1 min a 35°C y 2 min a 72 ºC, con una etapa de extensión de10 min a 72 ºC.

III.8.6. Análisis de los productos de RT-PCR

Con este fin se sembraron 10 µl de cada producto de RT-PCR en un gel de agarosa al 3% en buffer TAE 1X. En uno de los carriles del gel se sembró 3 µl del marcador de peso molecular (100 pb DNA markers de Promega). La electroforesis se llevó a cabo a 80V durante 30 min en buffer TAE 1X y luego se visualizó el gel en transiluminador.

Con la finalidad de cuantificar los productos obtenidos, se planteó seguir la siguiente metodología: el gel se fotografía utilizando un filtro UV utilizando una cámara digital. La intensidad de cada banda es medida utilizando el programa Scion Image del NIH. La abundancia relativa de cada banda es entonces normalizada con respecto al gel control (GAPDH), calculándose como la relación de la intensidad de la banda de cada gen blanco con respecto a la intensidad de la banda perteneciente a GAPDH.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS

PARTE I

PARTE I

DIVERSIDAD GENÉTICA DE *A. quebracho-blanco* MEDIANTE EL USO DE MARCADORES MOLECULARES RAPDS

IV.1. Análisis de los patrones RAPDs

En una primera instancia, se analizaron los patrones de amplificación en un grupo de 30 ejemplares de *A. quebracho-blanco* seleccionados al azar, utilizando 20 *primers* de 10 pb del Kit A de *Operon Technologies*. Se controló la reproducibilidad de los patrones obtenidos con cada primer, repitiendo las amplificaciones de algunas muestras en días distintos. De este modo según el número de bandas amplificadas y la reproducibilidad de las mismas, se seleccionaron 10 *primers* para ser utilizados en las amplificaciones posteriores.

La amplificación de las 129 muestras con estos 10 *primers* seleccionados permitió obtener un total de 133 bandas polimórficas, con un tamaño que varió entre 70 a 2100 pb. La Tabla IV.1 muestra las secuencias de nucleótidos, el número de bandas polimórficas obtenidas con cada uno de los *primers* seleccionados y el rango de tamaño de las bandas obtenidas con cada uno de ellos.

Tabla IV.1. Secuencia de los *primers* seleccionados de la Serie A de Operon Technologies (OPA).

Primers	**Secuencia**	**Nro. de bandas polimórficas**	**Rango de Tamaño (pb)**
OPA-01	5'-CAGGCCCTTC-3'	11	600 - 2000
OPA-02	5'-TGCCGAGCTG-3'	5	700 - 1450
OPA-05	5'-AGGGGTCTTG-3'	16	400 - 1600
OPA-07	5'-GAAACGGGTG-3'	9	300 - 2100
OPA-08	5'-GTGACGTAGG-3'	20	200 - 2000
OPA-10	5'-GTGATCGCAG-3'	20	250 - 1800
OPA-11	5'-CAATCGCCGT-3'	17	70 - 1450
OPA-16	5'-AGCCAGCGAA-3'	15	350 - 2000
OPA-18	5'-AGGTGACCGT-3'	12	250 - 1200
OPA-20	5'-GTTGCGATCC-3'	8	350 - 2000

En general cada sitio de estudio presenta un patrón RAPD particular, donde algunas bandas se presentan de forma diferencial entre los sitios evaluados y otras se encuentran presentes en la mayoría de las muestras.

En la Figura IV.1, se muestran como ejemplo, patrones RAPDs amplificados con el *primer* OPA-16 para algunas muestras de los distintos sitios de estudio. En los cinco sitios de estudio, sólo algunas muestras no presentan amplificación con este *primer*, entre ellas QL4, SJ9, SJ13, BV4, C9, C17, SG10, SG11 y SG18. Otras muestras presentan un patrón diferencial, como BV1.

Algunos sitios de estudio, presentan bandas en forma diferencial, por ejemplo: la banda de 950 pb únicamente presente en ejemplares de los sitios QL y de SG y la banda de 1050 pb, presente en los ejemplares de SJ, BV y C. Algunas muestras presentan bandas diferenciales, como por ejemplo, la banda de 500 pb presente en QL3, SJ1, SJ2, SJ3, SJ4 y C15. Por otra parte, dos bandas de 600 pb y 1200 pb, se presentan de prácticamente en todos las muestras analizadas.

Los patrones de amplificación obtenidos con el primer OPA-11 para algunos ejemplares se muestran en la Figura IV.2. En este caso se observan, algunas bandas de presencia casi constante entre los ejemplares de los distintos sitios, entre ellas, las bandas de 400 pb, 500 pb, 700 pb y 950 pb. De estas bandas mencionadas, el sitio de estudio C sólo presenta las bandas de 500 pb y de 700 pb.

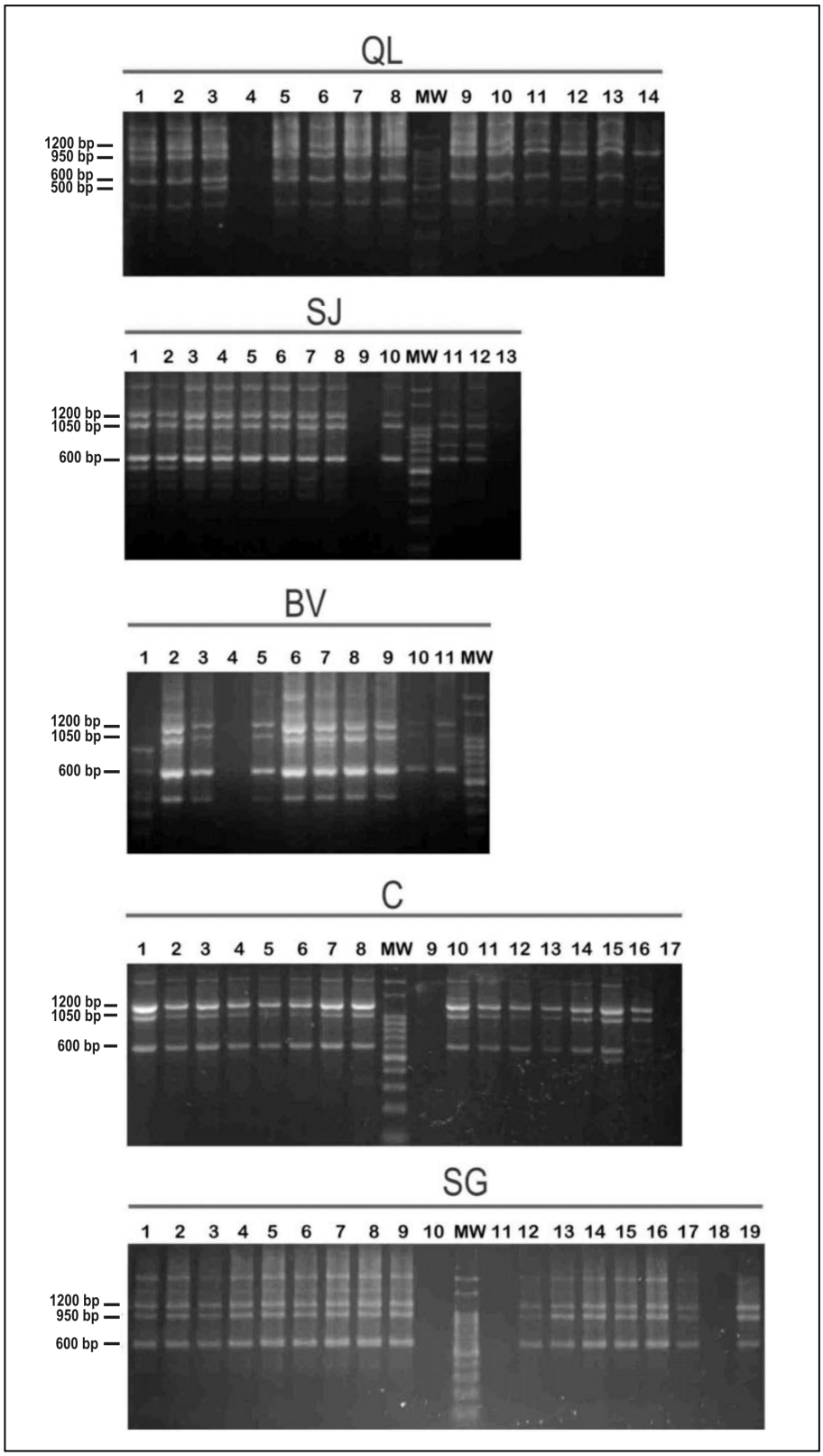


Figura IV.1. Patrones de amplificación RAPDs obtenidos con el *primer* OPA 16 en muestras de QL, SJ, BV, C y SG. Las muestras están numeradas para cada sitio. MW (marcador de peso molecular).

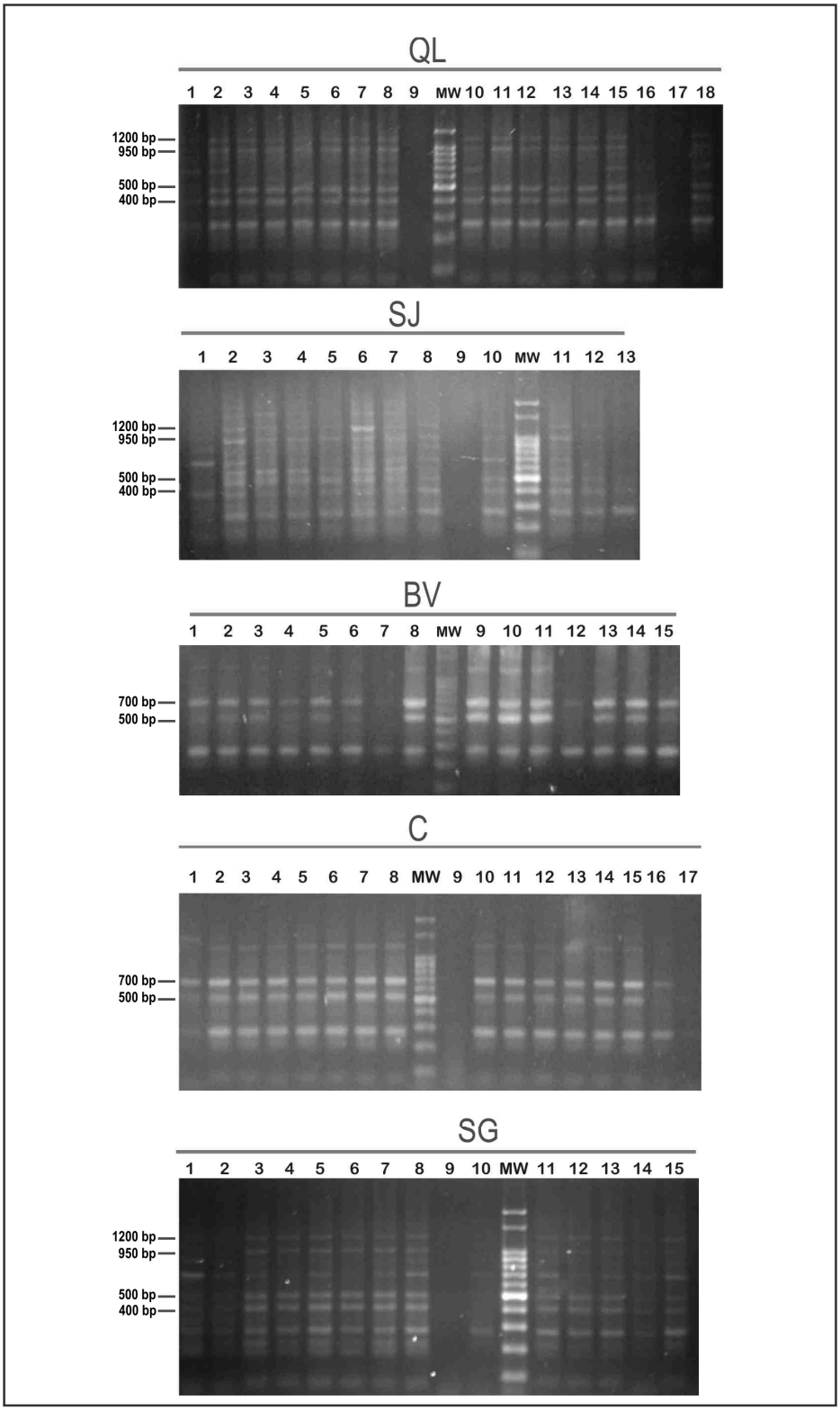


Figura IV.2. Patrones de amplificación RAPDs obtenidos con el *primer* OPA 11 en muestras de QL, SJ, BV, C y SG. Las muestras están numeradas para cada sitio. MW (marcador de peso molecular).

IV.2. Análisis estadístico

A fin de realizar el análisis estadístico de los datos obtenidos se construyó una Matriz Básica de Datos (MBD), codificando la presencia o ausencia de cada banda RAPDs observada. De este modo se obtuvo una MBD de 133 filas y 129 columnas, correspondientes a las 133 bandas polimórficas y a las 129 muestras analizadas. Los resultados obtenidos serán descriptos en tres Secciones, a saber: *IV.2.1.* Análisis de agrupamiento, *IV.2.2.* Análisis de Coordenadas Principales y *IV.2.3.* Estructura Genética Poblacional.

IV.2.1. Análisis de agrupamiento

El análisis de agrupamiento se realizó utilizando el programa NTSYS 2.01e (Rohlf 1998), donde a partir de la MBD se construyó la matriz de similitud (MS) entre todos los pares de individuos, utilizando el Coeficiente de Asociación de Jaccard (CAJ). En el análisis de agrupamiento se utilizó UPGMA, obteniéndose el dendrograma mostrado en la Figura IV.3.

En el dendrograma se evidencian claramente cinco grupos poblacionales. Los ejemplares pertenecientes a QL conforman el grupo G1, a este grupo se asocian la mayoría de los ejemplares de SJ, constituyendo el grupo G2. Los ejemplares correspondientes al sitio C se asocian en un tercer grupo, G3, que se asocia a los dos grupos anteriores, con excepción de los ejemplares C9, C17 y C33 que poseen muy bajo coeficiente de asociación. Los grupos G4 y G5 asocian a los ejemplares de BV y SG respectivamente. Al grupo G4 se asocian también SJ13 y SJ14, siendo los únicos SJ que no se asocian al grupo G2. Algunos ejemplares (C9, C17 y C33) se unen al dendrograma con menor coeficiente de asociación. Estos ejemplares junto al ejemplar SG18, que se une en última instancia con el menor coeficiente (0,03), quedan aislados del resto de los ejemplares en el dendrograma.

Es así como de acuerdo a la asociación de los ejemplares de *A. quebracho-blanco* en los distintos grupos del dendrograma (G1, G2, G3, G4 y G5) se pueden definir cinco poblaciones: G1 (Pop 1-QL), G2 (Pop 2-SJ), G3 (Pop 4-C), G4 (Pop 3-BV) y G5 (Pop 5-SG).

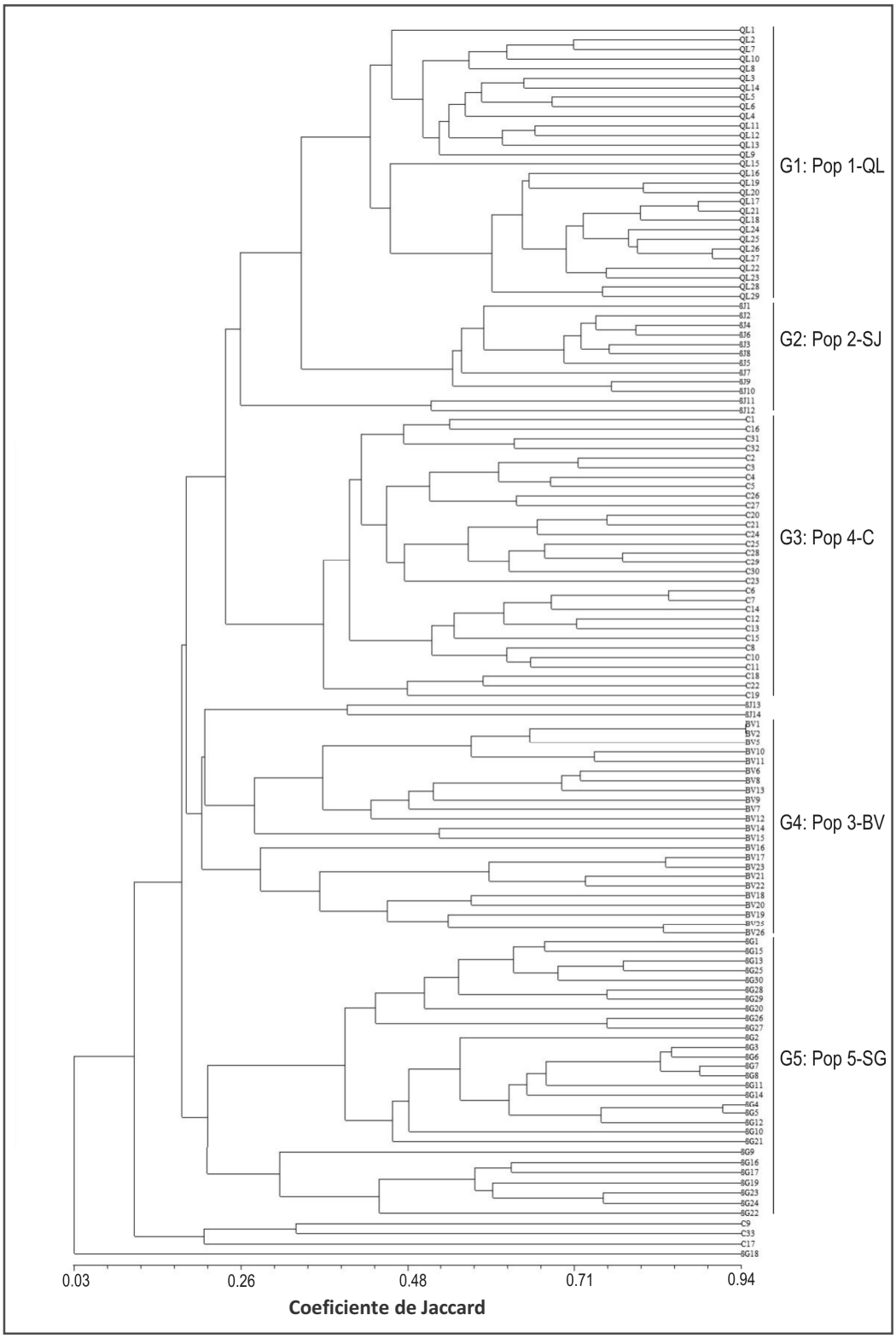


Figura IV.3. Dendrograma de las muestras de Pop 1-QL, Pop 2-SJ, Pop 3-BV, Pop 4-C y Pop 5-SG obtenido mediante análisis de agrupamiento usando UPGMA. La escala (0,03 a 0,94), indica la similitud genética calculada con el Coeficiente de Jaccard.

En la Figura IV.4 se muestra el dendrograma basado en la distancia genética de Nei (1972) (Tabla IV.2), realizado en POPGENE (ver. 1.32) (Yeh *et al.* 1997) mediante Neighbor de PHYLIP version 3.5., utilizando el método UPGMA. En este dendrograma, la primera asociación se observa entre las poblaciones Pop 3-BV y Pop 5-SG con una distancia genética de 0,0922; seguida por la asociación con Pop 4-C. Se observa que estas tres poblaciones (Pop 3-BV, Pop 4-C y Pop 5-SG) forman un primer grupo en el cluster (Grupo 1). En un grupo aparte (Grupo 2), se observan Pop 1-QL y Pop 2-SJ asociados a una distancia genética de 0,1545. La asociación en base a la distancia genética de Nei (1972), resulta similar a la obtenida con el coeficiente de asociación de Jaccard. En la Tabla IV.3 se observan las distancias entre los puntos numerados del dendrograma y las distintas poblaciones.

Tabla IV.2. Valores de similitud genética (superior a la diagonal) y distancia genética (inferior a la diagonal) - Nei (1972), de los 129 ejemplares de *A. quebracho-blanco* pertenecientes a las cinco poblaciones.

Población	Pop 1-QL	Pop 2-SJ	Pop 3-BV	Pop 4-C	Pop 5-SG
Pop 1-QL	****	0,8568	0,8486	0,8275	0,8220
Pop 2-SJ	0,1545	****	0,8433	0,8564	0,8252
Pop 3-BV	0,1642	0,1704	****	0,8830	0,9119
Pop 4-C	0,1893	0,1550	0,1245	****	0,8756
Pop 5-SG	0,1960	0,1922	0,0922	0,1329	****

Tabla IV.3. Valores de distancias entre los puntos del dendrograma y las distintas poblaciones.

Entre	Distancia entre puntos
4 y 3	**1.166**
3 y Pop 1-QL	**7.727**
3 y Pop 2-SJ	**7.727**
4 y 2	**2.460**
2 y 1	**1.822**
1 y Pop 3-BV	**4.611**
1 y Pop 5-SG	**4.611**
2 y Pop 4-C	**6.433**

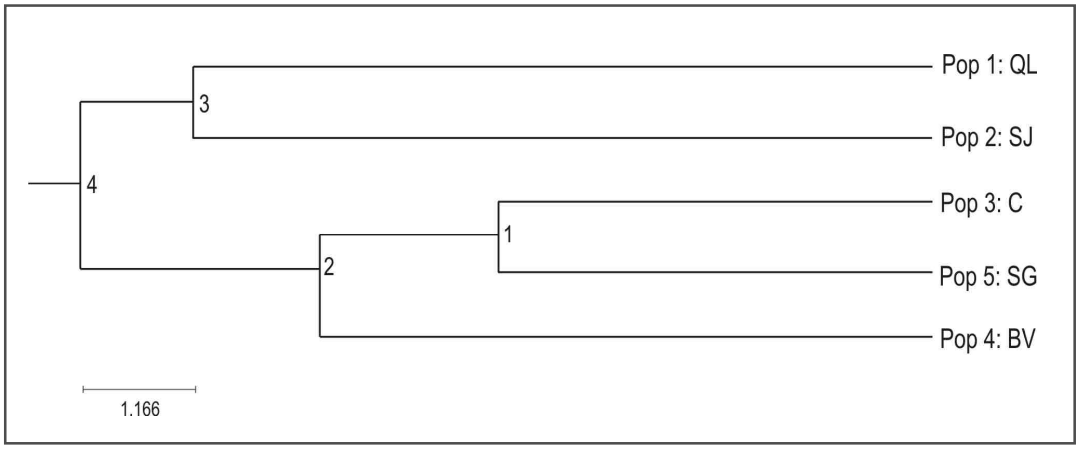


Figura IV.4. Dendrograma basado en la distancia genética de Nei (1972) obtenido con POPGENE (version 1.32) (Yeh *et al.* 1997), mostrando la relación genética existente entre las poblaciones estudiadas (Pop 1-QL, Pop 2-SJ, Pop 3-BV, Pop 4-C y Pop 5-SG). Se muestran los valores de distancia genética obtenidos entre las poblaciones.

IV.2.2. Análisis de coordenadas principales

El Análisis de Coordenadas Principales utilizando el programa GenAlex versión 6.1. permitió evaluar las similitudes entre los ejemplares de *A. quebracho-blanco* de los distintos sitios de estudio. En la Figura IV.5 se muestra el diagrama de dispersión de cada descriptor en el plano determinado por la primera y la segunda coordenadas principales. Las primeras tres coordenadas principales acumulan una variabilidad de 31,54%; 20,98% y 16,98% del total de variación, con un valor acumulativo del 69,5%. El Análisis de coordenadas principales confirma lo observado en el análisis de agrupamiento.

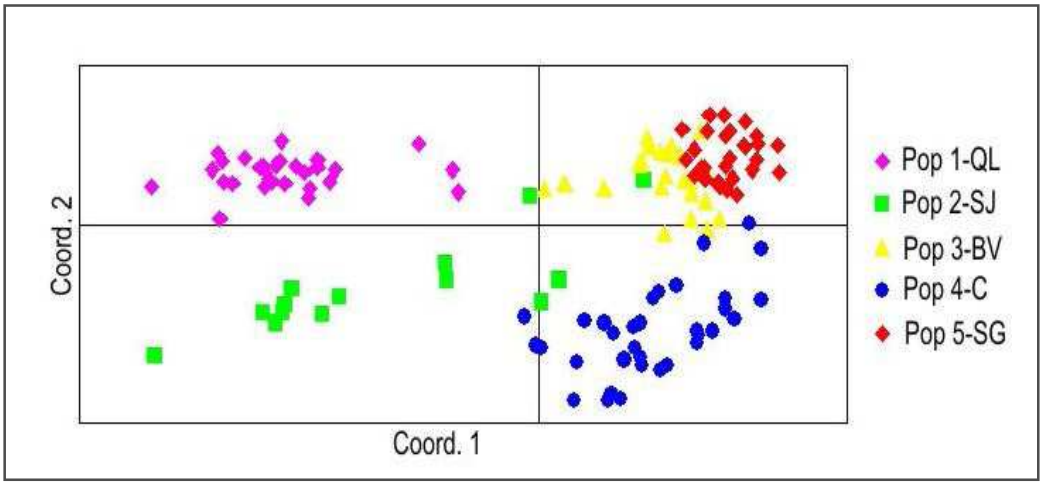


Figura IV.5. Diagrama de dispersión para los 129 ejemplares pertenecientes a las cinco poblaciones estudiadas (Pop 1-QL, Pop 2-SJ, Pop 3-BV, Pop 4-C y Pop 5-SG) según el peso de cada ejemplar sobre la primer y segunda coordenadas (Coord. 1 y Coord. 2).

IV.2.3. Estructura Genética Poblacional

A partir de la MBD se estimaron los valores medios de los descriptores de la estructura genética para el total de individuos analizados (***N***). De este modo, utilizando el programa POPGENE versión 1.32, se estimó el número de alelos observados ***(na)***; el número efectivo de alelos por locus ***(ne)***; la diversidad genética de Nei (1973) ***(h)*** y el porcentaje de loci polimórficos para cada sitio de estudio ***(P)***. Los valores de estos descriptores se muestran en la Tabla IV.4.

En la Tabla IV.4 se observa que el porcentaje de loci polimórficos **(P)** varía entre los distintos sitios de estudios, desde 48,9% en SG a 65,4% en QL y SJ. Del mismo modo, al analizar la diversidad genética de Nei (1973) ***(h)*** se observan los mayores valores para QL y SJ (0,183 y 0,214 respectivamente).

Tabla IV.4. Descriptores de la estructura genética de *A. quebracho-blanco* en los diferentes sitios de estudio. **N**: total de individuos; **na**: número de alelos observados; **ne**: número efectivo de alelos por locus - Kimura & Crow (1964); **h**: diversidad genética de Nei (1973); **P**: porcentaje de loci polimórficos.

Sitios de estudio	***N***	**na**	**ne**	**h**	**P**
Pop 1-QL	29	1,654	1,310	0,183	65,4%
Pop2-SJ	14	1,654	1,351	0,214	65,4%
Pop3-BV	23	1,556	1,296	0,179	55,6%
Pop4-C	33	1,556	1,272	0,165	55,6%
Pop5-SG	30	1,489	1,257	0,151	48,9%
Total	128	2,000	1,425	0,266	100%

Con el objetivo de estudiar la partición de la diversidad genética a nivel intra e interpoblacional, se utilizaron dos herramientas, a saber: el índice de Shannon-Weaver y el Análisis de la Varianza Molecular (AMOVA) (Excoffier *et al*. 1992).

En la Tabla IV.5 se detallan los valores estimados de diversidad intrapoblacional (Ho) obtenidos mediante el índice de Shannon-Weaver al ser analizado con cada *primer* en particular y con todos los *primers;* la diversidad promedio poblacional (Hpop) y la diversidad estimada para la especie (Hsp). La mayor diversidad genética intrapoblacional (Ho) se obtuvo con el *primer* OPA 8 en la población BV (Ho = 2,56) y algo menor con el *primer* OPA 11 para Pop 2-SJ y Pop 3-BV (Ho = 2,43 y Ho= 2,41 respectivamente). La menor diversidad genética (Ho = 0,00) se obtuvo con los *primers* OPA 2 y OPA 20 para Pop 3-BV y Pop 5-SG. Los valores de Ho para todos los *primers* se encuentran en el rango de 1,38 a 1,95, valores obtenidos con Pop 5-SG y Pop 2-SJ respectivamente.

Los resultados obtenidos (Tabla IV.6) evidencian una diversidad poblacional promedio para todos los ejemplares (Hpop) de 1,68. La mayor diversidad genética promedio por *primer* corresponde al *primer* OPA 11 (Hpop= 2,23) y la menor al *primer* OPA 2 (Hpop= 0,78). La diversidad de especie (Hsp) fue de 2,20. Los resultados obtenidos según el índice de Shannon-Weaver indican que el 75% de la diversidad genética corresponde al componente intrapoblacional, calculada como Hpop/Hsp, en tanto que el 25% corresponde al componente interpoblacional.

Tabla IV.5. Diversidad genética de las poblaciones Pop 1-QL, Pop 2-SJ, Pop 3-BV, Pop 4-C y Pop 5-SG estimada mediante índice de Shannon – Weaver. Diversidad intrapoblacional (Ho) por *primer* en particular y con todos los *primers;* la diversidad promedio poblacional (Hpop) y la diversidad estimada para la especie (Hsp).

Promedio	**H**				
	Pop 1-QL	**Pop 2-SJ**	**Pop 3-BV**	**Pop 4-C**	**Pop 5-SG**
OPA-1	1,68	1,92	0,21	1,12	1,80
OPA-2	1,10	1,45	0,00	1,36	0,00
OPA-5	2,11	2,06	2,23	2,27	1,57
OPA-7	1,46	1,49	1,73	1,51	0,62
OPA-8	2,22	2,13	2,56	2,09	1,36
OPA-10	2,25	2,18	2,09	1,71	2,14
OPA-11	2,14	2,43	2,41	1,88	2,28
OPA-16	1,80	2,19	2,00	1,89	1,75
OPA-18	2,09	2,06	1,64	1,95	2,28
OPA-20	1,63	1,59	0,00	1,45	0,00
Promedio Ho	**1,85**	**1,95**	**1,49**	**1,72**	**1,38**

Tabla IV.6. Proporción de diversidad genética intra (Hpop/Hsp) e interpoblacional (Hsp - Hpop)/Hsp, estimada mediante índice de Shannon – Weaver para las cinco poblaciones estudiadas (Pop 1-QL, Pop 2-SJ, Pop 3-BV, Pop 4-C y Pop 5-SG).

Primers	**Hpop**	**Hsp**	**Hpop/Hsp**	**(Hsp - Hpop)/Hsp**
OPA-1	1,35	2,06	0,65	0,35
OPA-2	0,78	1,42	0,55	0,45
OPA-5	2,05	2,47	0,83	0,17
OPA-7	1,36	1,88	0,72	0,28
OPA-8	2,07	2,79	0,74	0,26
OPA-10	2,07	2,67	0,78	0,22
OPA-11	2,23	2,57	0,87	0,13
OPA-16	1,93	2,30	0,84	0,16
OPA-18	2,00	2,32	0,87	0,13
OPA-20	0,93	1,54	0,60	0,40
Promedio Ho	**1,68**	**2,20**	**0,75**	**0,25**

Mediante el test de Mann-Whitney W-test (Wilcoxon) se compararon las medianas de diversidad genética intra (Hpop/Hsp) e interpoblacional (Hsp - Hpop)/Hsp, encontrándose una diferencia estadísticamente significativa entre las mismas ($P < 0,05$; 95,0% de nivel de confianza).

La diversidad genética intrapoblacional e interpoblacional fueron también evaluadas mediante el Análisis de la Varianza Molecular (AMOVA) en GenAlex versión 6.1., donde el 63% de la diversidad corresponde a la diversidad genética intrapoblacional y el 37% a la diversidad genética interpoblacional (Figura IV.6). Los valores de $\Phi = 0,372$, con $p < 0,001$, revelan bajos niveles de diversidad correspondiente al componente interpoblacional. En la Tabla IV.6 se resumen los datos obtenidos en el AMOVA.

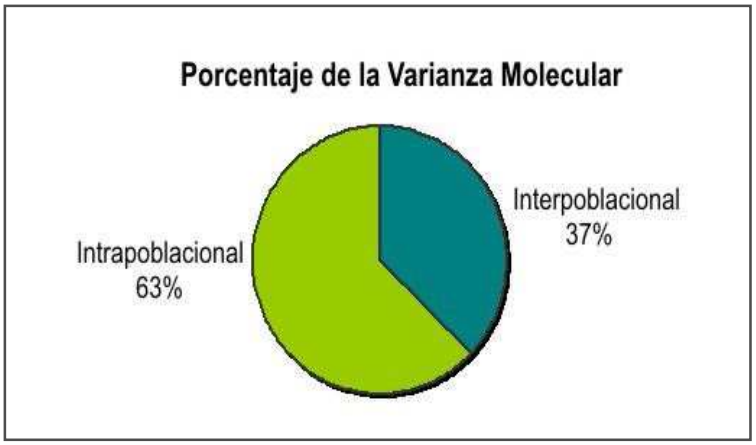


Figura IV.6. Porcentaje de la Varianza Molecular (AMOVA) de las cinco poblaciones en estudio (Pop 1-QL, Pop 2-SJ, Pop 3-BV, Pop 4-C y Pop 5-SG).

El AMOVA permite analizar también la proporción de la varianza molecular en los distintos niveles jerárquicos. En base a los resultados del agrupamiento y en el Análisis de Coordenadas Principales, las poblaciones fueron divididas en 2 subregiones. La Subregión I (SRI) comprende las poblaciones Pop 1-QL y Pop 2-SJ; en tanto que las poblaciones Pop 3-BV, Pop 4-C y Pop 5-SG son agrupadas en la Subregión II (SRII). Los resultados respecto al porcentaje de varianza molecular en los distintos niveles jerárquicos se muestran en la Tabla IV.7 y en la Figura IV.7, donde el 11% de la diversidad corresponde a la variación entre las subregiones SRI y SRII, existiendo un 29% de diversidad entre las poblaciones de ambas subregiones y un 60% de diversidad a nivel intrapoblacional.

Al ser analizadas las subregiones en forma separada (Figura IV.8), se evidencia una mayor diversidad interpoblacional para la subregión I (32%) respecto a la observada en la subregión II (22%).

Tabla IV.7. Valores de AMOVA para los 129 ejemplares estudiados. Donde g.l. son los grados de libertad, SC la suma de cuadrados, % es el porcentaje de variación y Φ es el estadístico de diferenciación genética. Los valores resultaron estadísticamente significativos con p < 0,001.

Origen de la variación	g.l.	SC	%	Φ	P
Interpoblacional	4	199.156	37%	0,372	< 0,001
Intrapoblacional	124	12.452	63%		
Entre regiones	1	301,612	11%	0,111	< 0,001
Interpoblacional	3	495,013	29%	0,327	< 0,001
Intrapoblacional	124	1543,987	60%		
Total	128	2340,612	100%	0,402	< 0,001

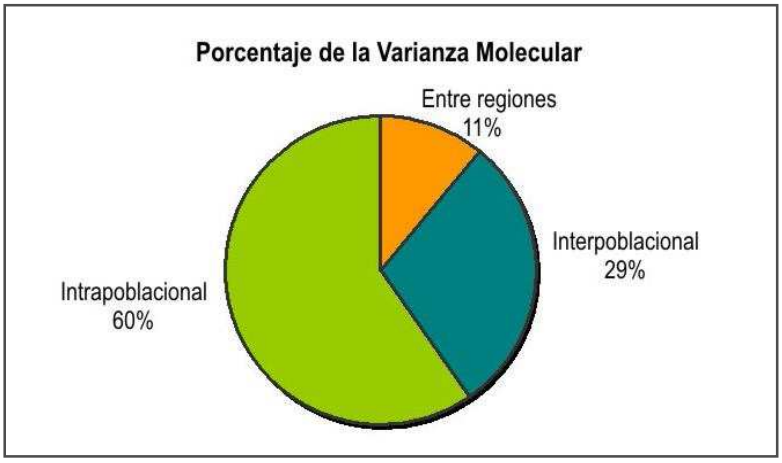


Figura IV.7. Porcentaje de la Varianza Molecular (AMOVA) en distintos niveles jerárquicos, con las cinco poblaciones agrupadas en 2 regiones: SRI (Pop 1-QL y Pop 2-SJ) y SRII (Pop 3-BV, Pop 4-C y Pop 5-SG).

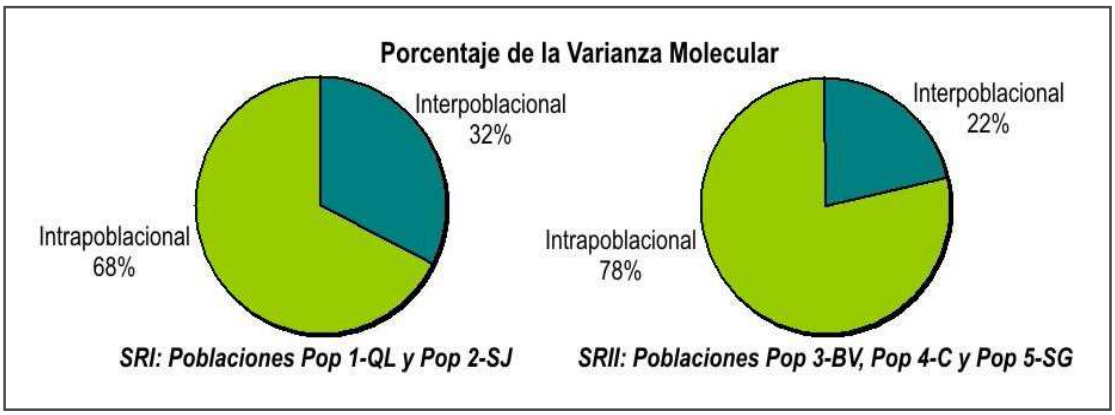


Figura IV.8. Porcentaje de la Varianza Molecular (AMOVA) en cada una de las subregiones: SRI (Pop 1-QL y Pop 2-SJ) y SRII (Pop 3-BV, Pop 4-C y Pop5-SG).

Además, se estimó la proporción de variación genética distribuida entre las poblaciones, mediante el Coeficiente de diferenciación génica (G_{ST}) usando POPGENE versión 1.32. El valor obtenido fue de 0,3480 para el total de las poblaciones, evidenciando que el 34.8% de la diversidad genética total corresponde al componente interpoblacional. El valor de G_{ST} obtenido es comparable con los valores de las componentes intra e interpoblacional, obtenidos mediante AMOVA (63% y 37% respectivamente).

El flujo génico (Nm) se calculó utilizando el estimador G_{ST}. El valor obtenido de Nm = 0,4684, evidencia que el flujo génico entre todas las poblaciones se encuentra algo restringido. Se estimaron también los valores obtenidos al analizar G_{ST} y Nm en cada una de las subregiones (Tabla IV.8). Mediante el test de Wilcoxon se compararon las medianas de G_{ST} para SRI, SRII y total, no encontrándose diferencia estadísticamente significativa entre las mismas (p=0,25; alpha=0,05).

Tabla IV.8. Valores de Ht, Hs, G_{ST} y Nm a nivel de las subregiones SRI (Pop1-QL y Pop2- SJ), SRII (Pop3-BV, Pop4-C y Pop5- SG) y a nivel de poblaciones totales. Entre paréntesis se muestra la desviación estándar.

Población	N	Ht	Hs	G_{ST}	Nm
SRI	43	0,2558 (0,0303)	0,1984 (0,0206)	0,2246	0,8631
SRII	86	0,2261 (0,0267)	0,1649 (0,0139)	0,2707	0,6735
Total	**129**	**0,2736 (0,0232)**	**0,2380 (0,0170)**	**0,3480**	**0,4684**

Test de Mantel

Como se expuso en el apartado de Material y Métodos, si la matriz de distancias genéticas y la matriz de distancias geográficas muestran relaciones similares, el estadístico Z debería ser mayor de lo que se espera por azar. Consideramos que el resultado obtenido es significativo si el valor del 95 por ciento o más de los estadísticos generados es mayor que el valor observado.

En nuestro caso, los resultados del test de Mantel (r= 0,311 con p= 0,001), indican que existe relación significativa entre distancia geográfica y distancia genética.

PARTE II

PARTE II

CARACTERIZACIÓN POR SECUENCIACIÓN DE BANDAS OBTENIDAS COMO MARCADORES RAPDS

IV.3. SELECCIÓN DE PRODUCTOS RAPDS DE INTERÉS

Tomando en consideración la calidad de las bandas obtenidas y la posibilidad de aislar un material de relativa pureza, se seleccionaron para analizar su secuencia, dos bandas RAPDs de 1200 y de 600 pb, obtenidas por la amplificación con los *primers* OPA-7 y OPA-16, respectivamente. Estas bandas, denominadas B1200 y B600, se encuentran presentes en un alto porcentaje de las muestras (77,9% y 76,7% respectivamente) de todos los sitios de estudio (Tabla IV.9).

Tabla IV.9. Porcentaje de presencia de las bandas B1200 y B600 respecto al gradiente de precipitaciones medias anuales (PMA) en los distintos sitios de estudio.

	Pop 1-QL	Pop 2-SJ	Pop 3-BV	Pop 4-C	Pop 5-SG	Promedio
B1200	96,6%	92,9%	82,6%	57,6%	60,0%	77,9%
B600	96,6%	85,7%	47,8%	66,7%	86,7%	76,7%
PMA	150	250	600	450	550	

IV.4. VERIFICACIÓN DE LA PRESENCIA DEL INSERTO

Se verificó la presencia de los insertos mediante digestión con la enzima de restricción *EcoRI* del plásmido recombinante, obteniéndose dos bandas correspondientes al plásmido desnudo y a los insertos de 1200 pb y 600 pb, respectivamente. La Figura IV.9, resume las etapas realizadas en la purificación de la banda, clonado en el vector pGem-T Easy y posterior verificación de la presencia del inserto mediante digestión con la enzima *EcoRI*.

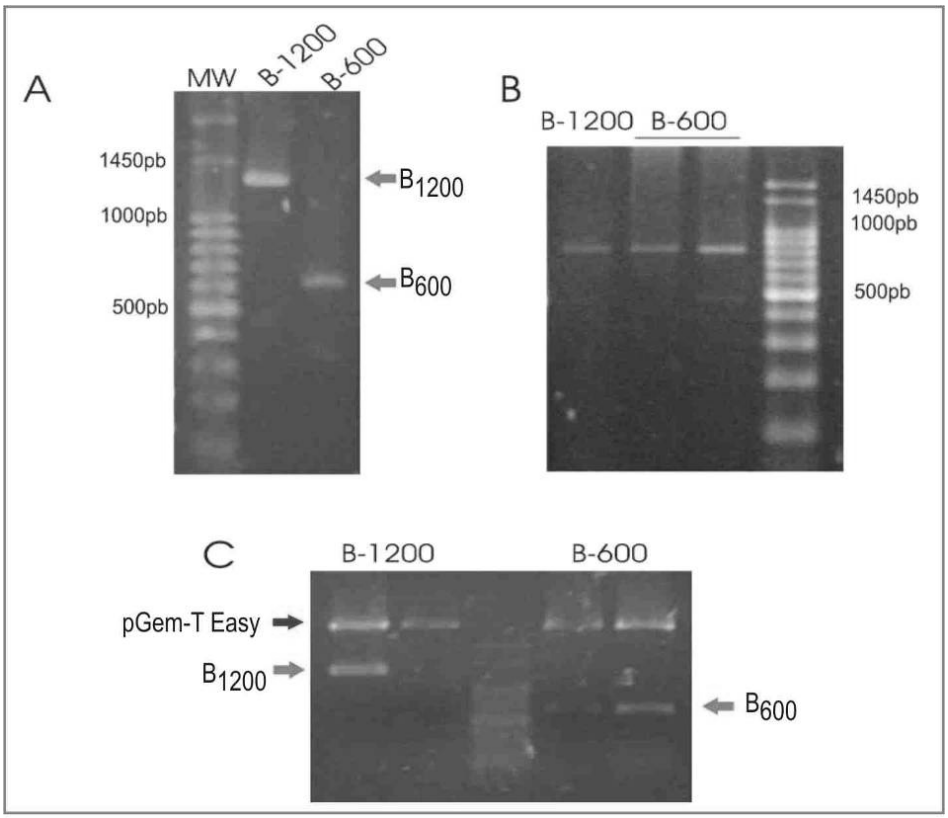


Figura IV.9. A. Reamplificación de la banda purificada con los *primers* OPA 7 y OPA 16 que dieron origen a la banda; B. Producto de PCR del inserto con *primers* T7 y SP6 del vector pGem-T Easy; C. digestión del plásmido recombinante con *EcoRI*.

IV.5. SECUENCIACIÓN DE LOS PRODUCTOS RAPDS SELECCIONADOS

En los cuadros que se incluyen a continuación se reproduce el resultado de la secuenciación de los productos seleccionados, utilizando los *primers* del promotor T7 y del promotor SP6, para los marcadores B1200 y B600:

Marcador B1200

B1200 ***primer SP6***

NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNCTCCNNTATGNTCGACCTGCAGGCGGCCGCG
AATTCACTAGTGATTGAAACGGGTGTTATTTCTAACTGATGGCTAATATTAATCAACTT
TTGCAAATTCAGGATGTTAGCCGCACCGTGGATGCGATGAATACACTGATGGAAAGTT
CTGTTATCGCCAGCTTCTAGTGCTTGAAACGCAGCGGGTAGATCTTTATGCGTTTCATG
CTGGAAAGTCATGAGAATCTCCTGCATCAGATGTAGATCGTTCGCCGTATTATTTTTCA
GGGCTTCGATATCAAGGTGGCGATACTGAGGTGCAATATGCGCAACTTGGTGTAACTG
ACTTAAATGTGTTTTCAGTACATCCAGGGTCAACGGTTTGAACAAACATAAGTTCATG
CCGCAACTTAACCCTTTTTCACGTTCGTTAGCCTGTGCGTTGGCTGTAAGCCCCCAGAT
GGGTAAGGAAGAATTTTGCTCACGGAGTTTGCGAGTCAACTCAAAACCATCCATATTC
CGCATATTAACGTCAGTAATAAGCAGATCATAATGTTGCATACTGACTTTGTGTAGCG
CTTGCACACCATCAGTGGCTTCATCAACATCATATCCTAATAGATTTAGCTGGCGTTTG
AGTAATAGCCTGTTGGTCGGATGATCATCCGCGATTAATATGCTCAACTTTTCAGGTAG
TGTGATGGGTTGTTCTGCTTTTGCCTCGACGGTCGCCACTTGCTGGCTAATTTCTACCG
GGATTGTGATCGTAAATGTTGTTCCTATGCCTGATGACTTTCTAATGACNAATCGCCCT
GCATATTTTTTAATTAATTCTTTGCAGATCATTAAGCCTAANCCNGAACCTGNTTGCTG
ACGACCTGCACTTGTTTGGCTGNANCGTTNNAACANNNNNTGNTNGTNCTTNCTGCGA
TNNTNCNNCTTNNNNNANCCATAATCGTCATTTTNANNANNGCGNNNNNGNNATCNA
NGTNACCN

B1200 ***primer T7***

NNNNNNNNNNNNNGNNNNNGCCGCNNTGGCGGCCGCGGGNATTCGATTGAAACGGG
TGGAGGCGATTTCNCTTGCCTACGCCACCGGACAATCACTCCTCGGCTTAATTGGTGA
AATCCTTGATGTCGACAAAATTGAATCGGGTAACTATCAACTTCAACCACAATGGGTC
GATATCCCTACTTTAGTCCAGAACACTTGTCACTCTTTCGGTGCGATTGCTGCAAGCAA
ATCGATCGCATTAAGTTGCAGCAGTACGTTTCCTGAACATTACCTGGTTAAGATCGAC
CCTCAGGCGTTTAAGCAGGTCTTATCAAATTTACTGAGTAATGCTCTCAAATTTACCAC
CGAGGGGGCAGTAAAAATTACGACCTCCCTGGGTCACATTGATGACAACCACGCTGTT
ATCAAAATGACGATTATGGATTCTGGAAGTGGATTATCGCAGGAAGAACAACAACAA
CTGTTTAAACGCTACAGCCAAACAAGTGCAGGTCGTCAGCAAACAGGTTCTGGTTTAG
GCTTAATGATCTGCAAAGAATTAATTAAAAATATGCAGGGCGATTTGTCATTAGAAAG
TCNTCAGGCATAGGAACAACATTTACGATCACAATCCCGGTAGAAATTAGCCAGCAAG
TGGCGACCGTCGAGGCAAAAGCAGAACAACCCATCACACTACCTGAAAAGTTGAGCA
TATTAATCGCGGATGATCATCCGACCAACAGGCTATTACTCAAACGCCAGCTAAATCT
ATTAGGATATGATGTTGATGAAGCCACTGATGGTGTGCAAGCGCTACACAAAGTCAGN
ATGCAACATTATGATCTGCTTATTACTGACGTTNAATATGCGGAATATGGATGGNTTTT
GAGTNNACTCGNNAACTCCGNGAGNNAAATNCCTTNCNTACCCANCNGGNGGNCTTN
ANNNCAACGCACANGGCNNACGAACGNTGAAAAAGGNNNNAGNTGCNNNNNGAACT
NNNNTTNNNNNNCCNNNN

Marcador B600

B600 ***primer SP6***

NNNNNNNNNNNNNGTNGGGNGCTCTCCCNTATGGTCGACCTGCAGGCGGCCGCGAAT
TCACTAGTGNNNNNNCAGCGAATTTGTGGATTTCTTTGCCACCTATAAAGCGACGTTG
CCCGCGATTGGTCGTTTGATGAAAGTGTGCCGTGCGCGCGTTGTACCGCTGTTTCCGAT
TTATGATGGCAAGACGCATCGTCTGACGATTCAGGTGCGCCCACCGATGGATGATCTG
TTAGAGGCGGATGATCATACGATTGCGCGGCGGATGAATGAAGAAGTCGAGATTTTTG
TTGGTCCGCGACCAGAACAATACACCTGGATACTAAAATTGCTGAAAACTCGCAAACC
GGGCGAAATCCAGCCGTATAAGCGCAAAGATCTTTATCCCATCAAATAAAAAAGCCTC
TCGCGAGGAGAGGCCTTCGCCTGATGATAAGTTCAAGTTTGCTTCAGAATATTCGAAA
TCTGTTGAACTATCATTGAACTGTAGGCCGGATGTGGCGTTTTCGCCGCATCCGGCAAC
GTACTTACTCTACCGTTAAAATACGCGTGGTATTAGTAGAACCCACGGTACTCATCAC
GTCGCCCTGGGTGACAATCACCAGGTCACCAGACATCAAGTAACCTTTATCGCGCAGC
AGATTAACCGCTTCGCTGGCTAATCGAATTCCCGCGGCCGCCATGGCGGCCGGGAGCA
TGCGACGTCGGGCCCAANTTCGCCCTATAGNGNNNCGTATTACAATTCACTGGCCGNN
CGTTTTTACAACGTCNNGACTGGGAAAACCCNGGCGTTACCCAACTTANTCCGCCNTN
GCANNACATCCCCCCTTTCNCCNGNTGGGNGTANTANCGAANAAGGCCCGNACCGAT
CNN

B600 ***primer T7***

NNNNNNNNNNNNNNNNGNNNNNNGCCGCCNTGGCGGCCGCGGGANTTCGATTAGCC
AGCGAAGCGGTTANNCNNNNGNGCGATAAAGGTTACTTGATGTCTGGTGACCTGNNG
ATTGTCACCCAGGGCGACGTGATGAGTACCGTGGGTTCTACTAATACCACGCGTATTT
TAACGGTAGAGTAAGTACGTTGCCGGATGCGGCGAAAACGCCACATCCGGCCTACAG
TTCAATGATAGTTCAACAGATTTCGAATATTCTGAAGCAAACTTGAACTTATCATCAGG
CGAAGGCCTCTCCTCGCGAGAGGCTTTTTATTTGATGGGATAAAGATCTTTGCGCTTA
TACGGCTGGATTTCGCCCGGTTTGCGAGTTTTCANCAATTTTAGTATCCAGGTGTATTG
TTCTGGTCGCGGACCAACAAAAATCTCGACTTCTTCATTCATCCGCCGCGCAATCGTAT
GATCATCCGCCTCTAACAGATCATCCATCGGTGGGCGCACCTGAATCGTCAGACGATG
CGTCTTGCCATCATAAATCGGAAACAGCGGTACAACGCGCGCACGGCACACTTTCATC
ANACNACCAATCGCGGGCAACGNNNNTTNNNAGGTGGCAAAGAAATCCACAAATTCG
CTGGCTAATCACTAGTGAATTCGCGGCCGCCNGNNNGNCGACCATATGGGAGAGCTCC
CAACGCGTTGGATGCATAGCTTGAGTATTCTANANTGNCNCCTAAATAGCTNGNNGNA
ATCATGGNNATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCCGCTCACAAATT

El solapamiento de las secuencias obtenidas con los *primers* T7 y SP6 se realizó a fin de conformar la secuencia completa de los marcadores seleccionados. Las secuencias de nucleótidos fueron solapadas utilizando la función BLAST 2 SEQUENCE de BLASTN.

Para las secuencias correspondientes al marcador B1200 el solapamiento fue perfecto en 390 nucleótidos, obteniéndose una secuencia de 1257 pb (Figura IV.10). En tanto que para las secuencias correspondientes al marcador B600 el solapamiento perfecto fue de 569 nucleótidos, resultando en 591 pb de secuencia completa (Figura IV.11).

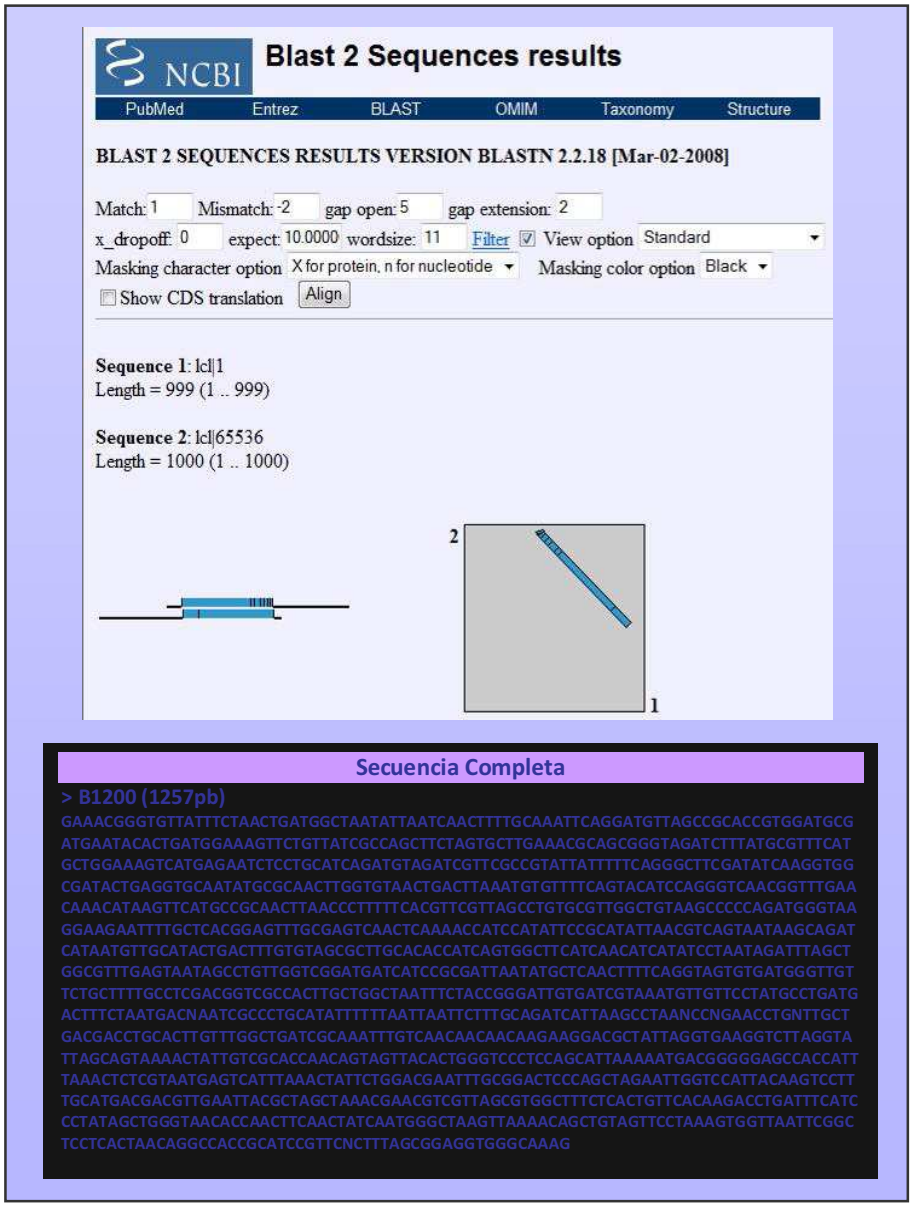


Figura IV.10. Solapamiento de secuencias obtenidas con los *primers* T7 y SP6 y secuencia completa del fragmento B1200.

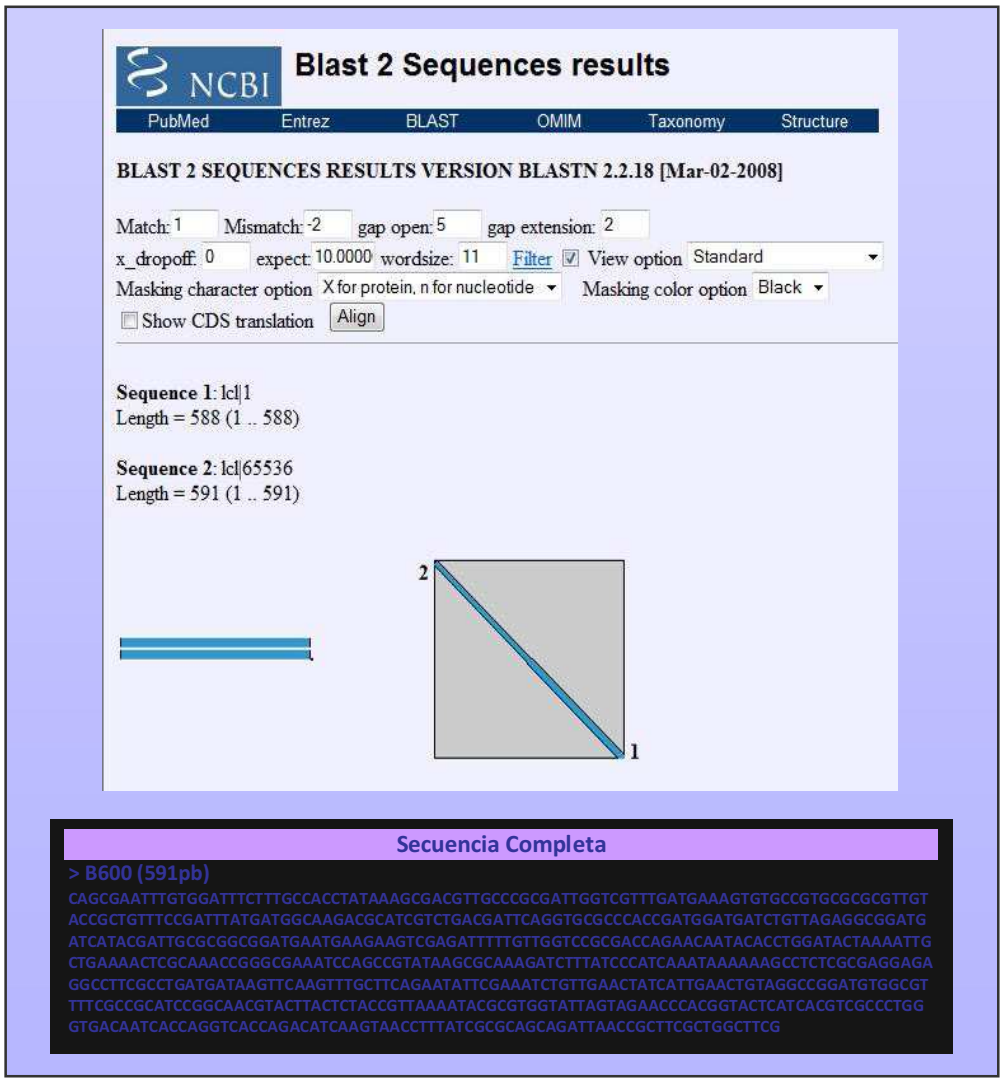


Figura IV.11. Solapamiento de secuencias obtenidas con los *primers* T7 y SP6 y secuencia completa del fragmento B600.

IV.6. ANÁLISIS DE HOMOLOGÍA CON SECUENCIAS CONOCIDAS

IV.6.1. Marcador B1200

Al ser analizado en el programa BLASTn, el fragmento de 1257 pb presentó homología (86%) con secuencias pertenecientes al "Sistema de Dos Componentes". En la Figura

IV.12 se muestran las secuencias con mayor porcentaje de homología. En las 20 primeras secuencias el valor de homología es muy similar en el orden de 240, y se refiere a reguladores de respuesta del sensor con actividad histidina quinasa (HK) o al sensor híbrido HK de dos componentes.

Sequences producing significant alignments:		Score (Bits)	E Value
ref|ZP 03043520.1|	sensor histidine kinase/response regulator...	243	4e-63
ref|ZP 03050689.1|	sensor histidine kinase/response regulator...	243	4e-63
ref|ZP 03027337.1|	sensor histidine kinase/response regulator...	242	5e-63
gb|AAF17563.1|	sensor protein EvgS1 [Escherichia coli]	242	5e-63
ref|YP 001459161.1|	hybrid sensory histidine kinase in two-co...	242	5e-63
ref|YP 311337.1|	hybrid sensory histidine kinase in two-compo...	242	5e-63
ref|ZP 03001571.1|	sensor histidine kinase/response regulator...	242	5e-63
ref|ZP 03068465.1|	sensor histidine kinase/response regulator...	242	5e-63
ref|YP 001463705.1|	hybrid sensory histidine kinase in two-co...	242	5e-63
ref|NP 416871.1|	hybrid sensory histidine kinase in two-compo...	242	5e-63
gb|AAF17564.1|AF201841 1	sensor protein EvgS4 [Escherichia coli]	242	5e-63
dbj|BAA03108.1|	EvgS [Escherichia coli]	241	1e-62
ref|YP 408785.1|	hybrid sensory histidine kinase in two-compo...	241	1e-62
ref|YP 001881179.1|	sensor histidine kinase/response regulato...	241	2e-62
ref|ZP 03065184.1|	sensor histidine kinase/response regulator...	239	3e-62
ref|YP 001744563.1|	sensor histidine kinase/response regulato...	238	7e-62
ref|NP 754788.1|	hybrid sensory histidine kinase in two-compo...	238	7e-62
ref|YP 541699.1|	hybrid sensory histidine kinase in two-compo...	238	8e-62
ref|YP 689843.1|	hybrid sensory histidine kinase in two-compo...	238	1e-61
ref|NP 708241.1|	hybrid sensory histidine kinase in two-compo...	238	1e-61
ref|NP 837948.1|	hybrid sensory histidine kinase in two-compo...	238	1e-61
ref|YP 670289.1|	hybrid sensory histidine kinase in two-compo...	237	2e-61
ref|NP 288940.1|	hybrid sensory histidine kinase in two-compo...	237	2e-61
ref|YP 405845.1|	hybrid sensory histidine kinase in two-compo...	234	1e-60
ref|ZP 03064499.1|	sensor protein EvgS [Shigella dysenteriae ...	152	7e-36

Figura IV.12. Homología en la secuencia de nucleótidos del marcador B1200 con secuencias de la base de datos (BLASTn).

La secuencia nucleotídica fue traducida con el programa Translate (EXPASY), obteniéndose una secuencia de 464 aminoácidos. Esta secuencia fue comparada con la Base de Datos de proteínas de una especie modelo en estudios genéticos en plantas como *A.thaliana* (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/seq/BlastGen/BlastGen.cgi?taxid=3702), presentando homología con las proteínas nombradas en la Figura IV.13.

- >gi|15229317|ref|NP_187108.1| EIN4 (ETHYLENE INSENSITIVE 4); receptor
- >gi|30690228|ref|NP_850864.1| ARR24 (ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATOR 24); two-component response regulator >gi|30697334|ref|NP_176808.3| ETR1 (ETHYLENE RESPONSE 1); two-component response regulator >gi|145357869|ref|NP_196633.2| AHK5 (CYTOKININ INDEPENDENT 2)
- >gi|15229263|ref|NP_187078.1| ARR22 (ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATOR 22); transcription regulator/ two-component response regulator
- >gi|42570473|ref|NP_850600.2| ARR1 (ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATOR 1); transcription factor/ two-component response regulator
- >gi|42564262|ref|NP_566561.2| ARR1 (ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATOR 1); transcription factor/ two-component response regulator
- >gi|15220515|ref|NP_176938.1| ARR11 (RESPONSE REGULATOR 11); transcription factor/ two-component response regulator >gi|18396292|ref|NP_564276.1| AHK3 (ARABIDOPSIS HISTIDINE KINASE 3)
- >gi|18421494|ref|NP_568532.1| AHK2 (ARABIDOPSIS HISTIDINE KINASE 2)
- >gi|186502893|ref|NP_180090.3| ARR12 (ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATOR 12); transcription factor/ two-component response regulator
- >gi|30677959|ref|NP_849925.1| WOL (WOODEN LEG)
- >gi|145359387|ref|NP_200616.3| ARR18 (ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATOR 18); transcription factor/ two-component response regulator
- >gi|15239829|ref|NP_199735.1| APRR4 (PSEUDO-RESPONSE REGULATOR 4); transcription factor/ two-component response regulator
- >gi|18379305|ref|NP_565277.1| WOL (WOODEN LEG)
- >gi|15240724|ref|NP_196338.1| ARR21 (ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATOR 21); transcription factor/ two-component response regulator

Figura IV.13. Secuencias homólogas de *A. thaliana* al marcador B1200.

Por otra parte, se buscaron dominios conservados en la secuencia de aminoácidos de la secuencia estudiada utilizando la herramienta *Conserved Domains* en BLAST (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi). Se evidenció de este modo, la presencia de dos dominios conservados: el dominio REC (*Signal Receiver Domain*) y el dominio HPT (*Histidine Phosphotransfer Domain*) propios de las proteínas pertenecientes a la Familia de las Histidina Quinasas de tipo híbrido del Sistema de Dos Componentes. En estos dos dominios se encontraron conservados los sitios de activación, de fosforilación, de reconocimiento intermolecular y de dimerización propios de los miembros del "Sistema de Dos Componentes" (Figura IV.14).

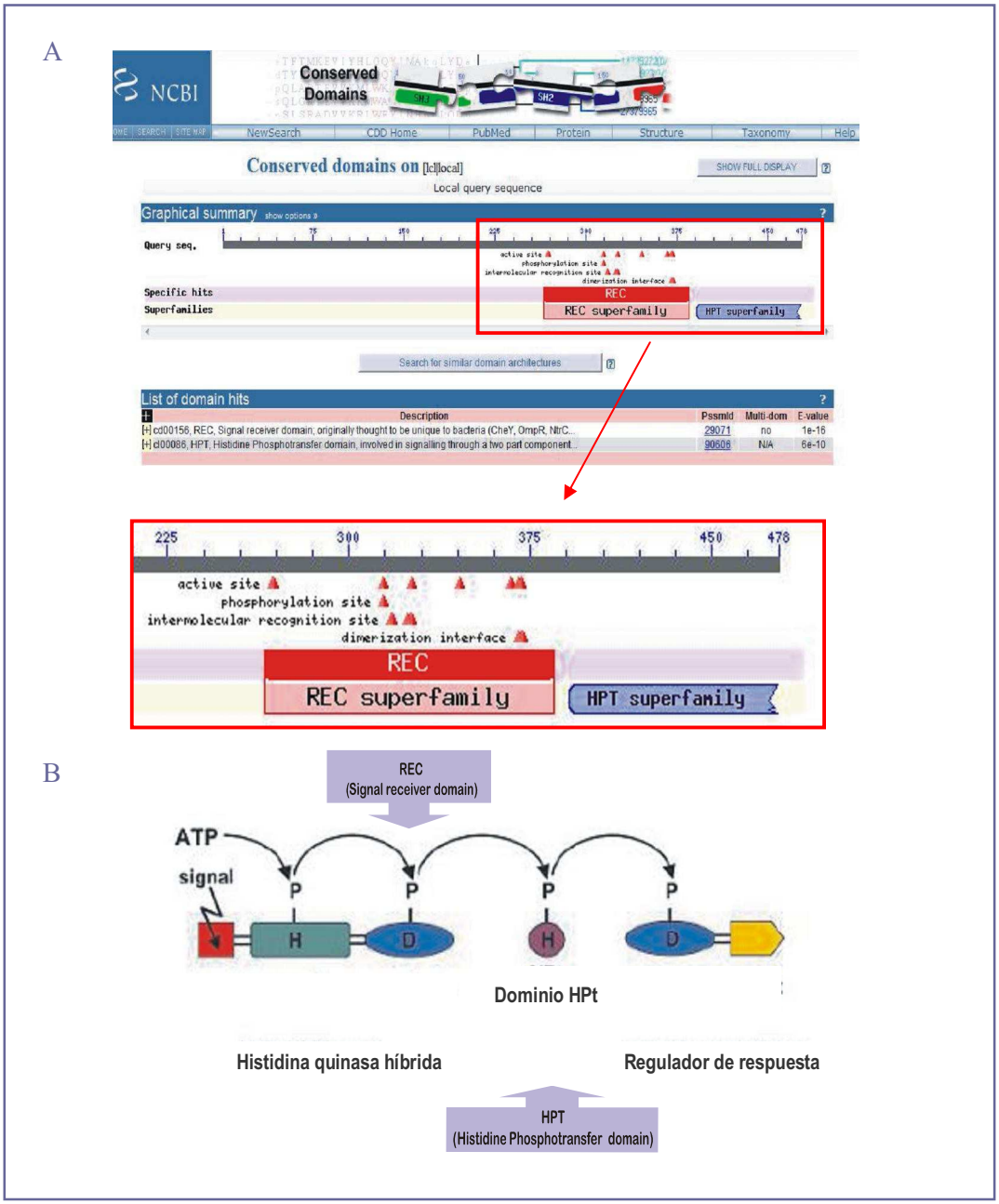


Figura IV.14. Panel A.-Presencia de dominios conservados REC y HPT en el marcador B1200 donde se observan los sitios de activación, fosforilación, reconocimiento intermolecular y dimerización conservados en la secuencia. Panel B.- Representación esquemática de las proteínas His quinasas híbridas, observándose los dominios conservados (Fuente: Lohrmann & Harter 2002).

IV.6.1.1. Alineamiento múltiple del marcador B1200

A fin de analizar la proximidad genética, se compararon por alineamiento múltiple la secuencia proteica de B1200 con las secuencias homólogas de *A. thaliana* que fueran obtenidas previamente (Figura IV.13), utilizando el programa *CLUSTAL-W* (http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html.) El resultado obtenido en dicho alineamiento se sintetiza en el Cladograma de la Figura IV. 15.

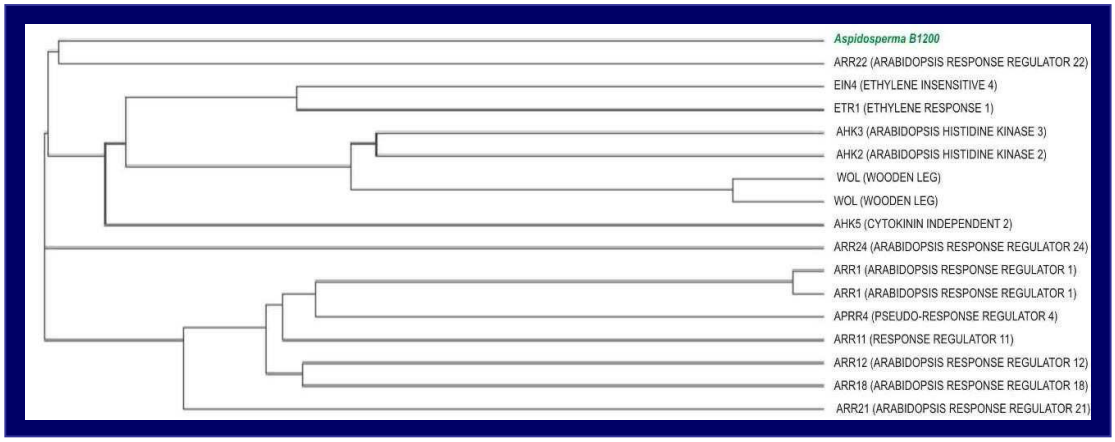


Figura IV.15. Cladograma obtenido tras el alineamiento múltiple de B1200 y sus homólogos en *A. thaliana.*

IV.6.2. Marcador B600

La secuencia de 591 pb no presentó homología con secuencias conocidas en plantas, tampoco presentó homología al ser traducida en el programa *Translate* (EXPASY). Al analizar la presencia de dominios conservados en esta secuencia se evidenció la presencia de un dominio de la familia de las Acetiltransferasas como se muestra en la Figura IV. 16.

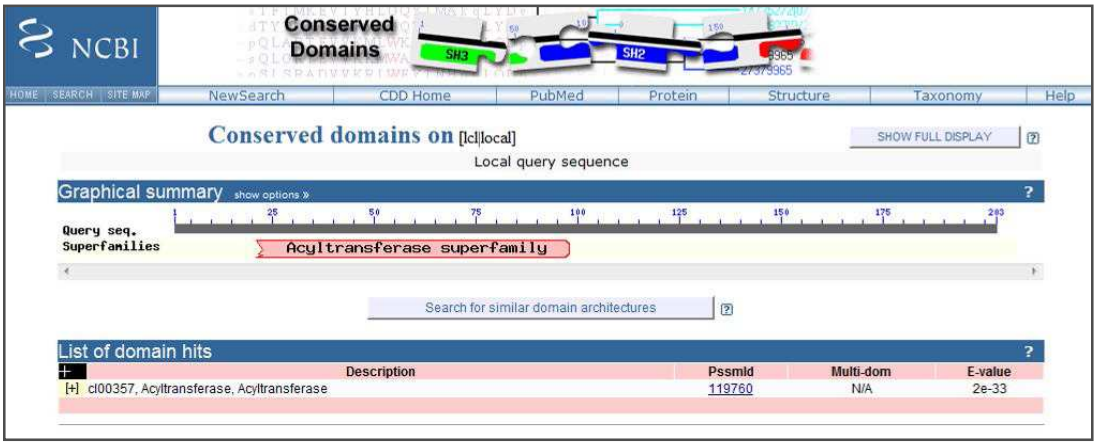


Figura IV.16. Presencia de dominios conservados Acetiltransferasa en el marcador B600.

IV.6.2.1. Alineamiento múltiple del marcador B600

El alineamiento múltiple del marcador B600, con secuencias conocidas que pertenecen a la familia de las Acetiltransferasas, dio como resultado el dendrograma que se muestra en la Figura IV.17.

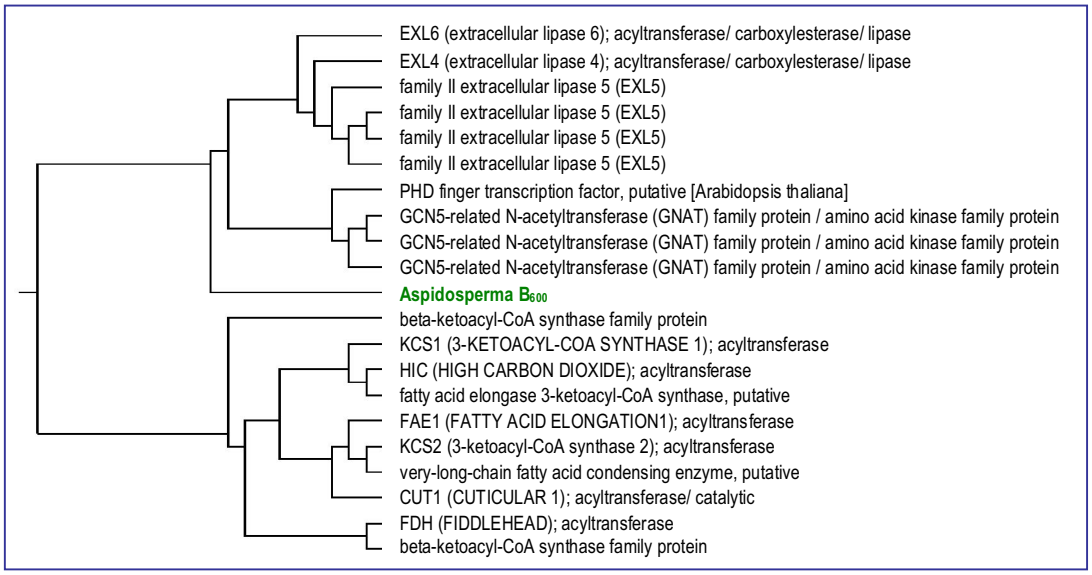


Figura IV.17. Dendrograma obtenido tras el alineamiento múltiple de B600 y secuencias con dominio acetiltransferasa en *A. thaliana.*

IV.7. PRESENCIA DE LOS MARCADORES SCAR

Se evaluó la presencia de los marcadores B1200 (Figura IV. 18) y B600 (Figura IV. 19) en muestras de los distintos sitios en estudio mediante el uso de *primers* específicos. Los *primers* se diseñaron de modo de amplificar un fragmento de la secuencia de B1200 y B600 del mayor tamaño posible, de 1059 pb para B1200 y de 558 pb para el marcador B600. Los *primers* utilizados poseen un tamaño de 20 nucleótidos y elevada temperatura de annealing (62 °C para B1200 y 60 °C para B600) de modo de aumentar la especificidad de la reacción.

Se analizaron 8 muestras de cada población, incluyendo muestras en las que se había detectado la banda y otras en las que no estaba presente. La amplificación en condiciones de alta astringencia (62 °C y baja concentración de cloruro de magnesio) del fragmento de 1059 pb dio lugar a varios productos, incluyendo fragmentos de menor peso molecular al esperado, como los de 850 pb, 700 pb, 550 pb, 420 pb, 330 pb y 170 pb que se observan en forma diferencial en las distintas poblaciones (Figura IV.18). Estos fragmentos podrían corresponder a otros miembros del Sistema de Dos Componentes, ya que varios autores postulan que se trata de un sistema multigénico (Dortay *et al.* 2008; Gao *et al*. 2008; Horak *et al.* 2008). A fin de caracterizar la banda de 850 pb, se la envió para secuenciación, sin embargo, no se obtuvo una secuencia única.

El producto de 591pb correspondiente al marcador B600 fue amplificado en 8 muestras de cada uno de los sitios en estudio y mostró una presencia constante, como se muestra en la Figura IV.19.

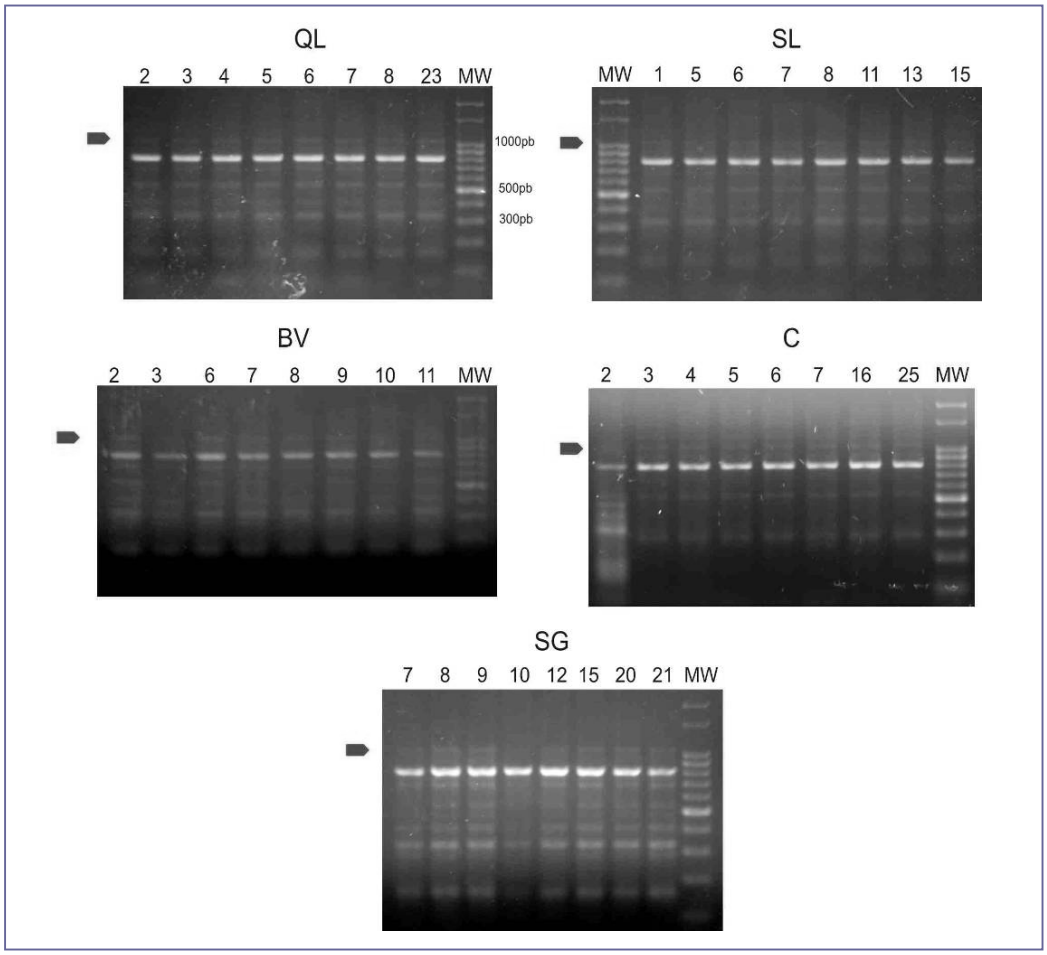


Figura IV.18. Amplificación con *primers* específicos para B1200 en las poblaciones estudiadas.

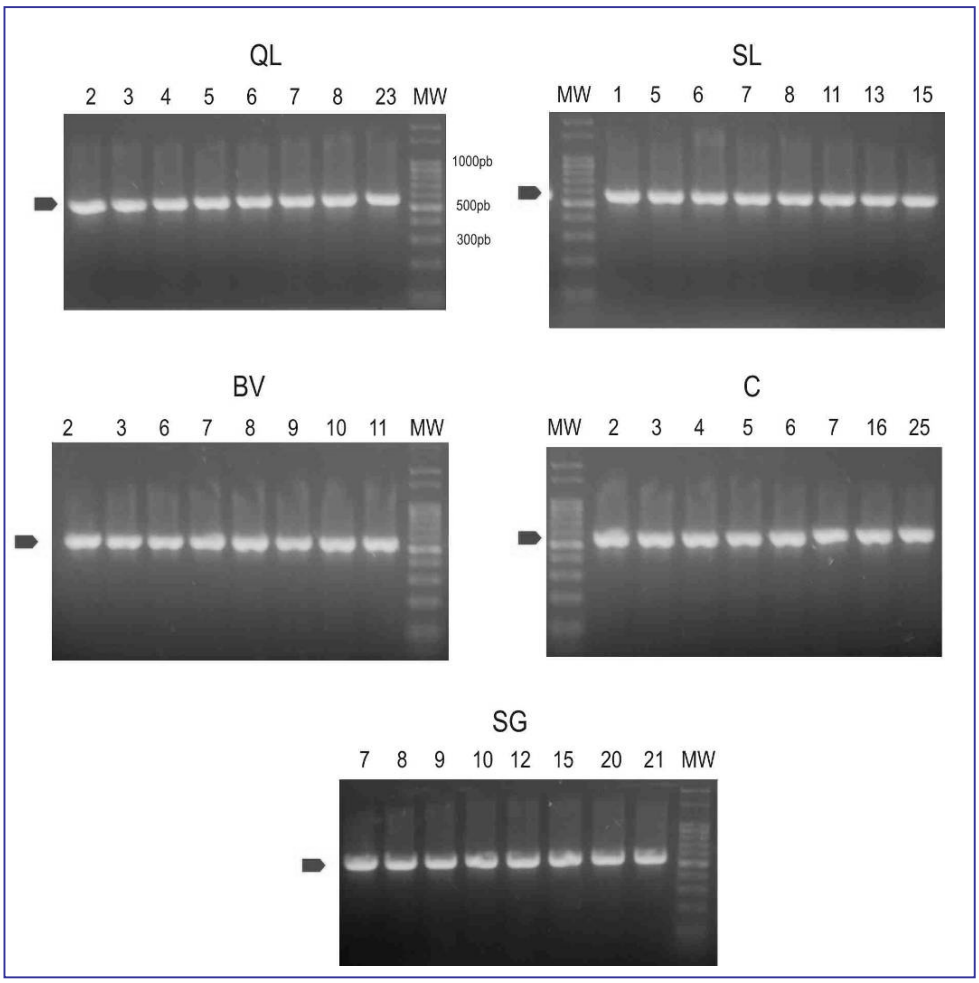


Figura IV.19. Amplificación con *primers* específicos para B600 en las poblaciones estudiadas.

IV.7.1. Detección de contaminación

A partir de esta etapa, luego de detectar la contaminación en los reactivos de PCR, se procedió a verificar la presencia de ambas bandas en dos muestras seleccionadas, y se optimizaron las condiciones de amplificación con los *primers* específicos diseñados a partir de la secuenciación previa.

IV.8. AMPLIFICACIÓN DE LOS MARCADORES SCAR EN REACTIVOS LIBRES DE CONTAMINACIÓN

Se logró amplificar B600 y B1200 a partir de reactivos libres de contaminación, corroborando la presencia de estos marcadores SCAR en *A. quebracho-blanco*. Se intentó poner a punto la amplificación de ambas bandas a fin de obtener un producto de PCR de condiciones óptimas para ser secuenciado. Para ello se variaron las concentraciones de $MgCl_2$, de dNTPs, de ADN muestra y de *primers*. También se llevó a cabo la amplificación bajo un amplio rango de temperaturas de '*annealing*' de los *primers*, desde 49°C a 58°C. Sin embargo, tras numerosos intentos, no se logró obtener un producto de PCR lo suficientemente puro para ser secuenciado. La Figura IV.20 muestra como ejemplo la amplificación de B1200 con *primers* específicos bajo distintas condiciones.

Con el fin de aumentar la pureza del producto de PCR se realizó la reamplificación de B1200 utilizando como templado el producto purificado obtenido partir de la amplificación con primers específicos (Figura IV.21).

Se purificaron los productos reamplificados y fueron enviados a secuenciar, sin embargo, se trataba de secuencias múltiples, por lo que no se pudo confirmar secuencia específica de las bandas analizadas.

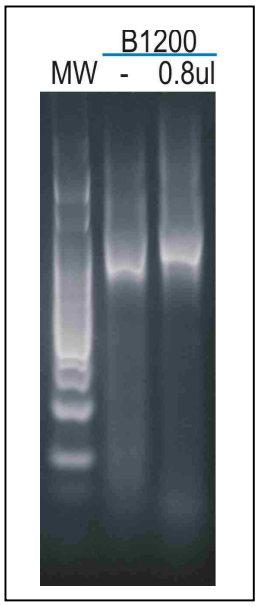


Figura IV.21. Reamplificación de B1200 donde se utilizó como templado el producto purificado de PCR a 55°C sin el agregado extra de $MgCl_2$. En esta amplificación se realizaron 10 ciclos a 56°C y 20 ciclos a 57°C, en ausencia (-) o en presencia (0.8 ul) de $MgCl_2$ 50 mM adicional.

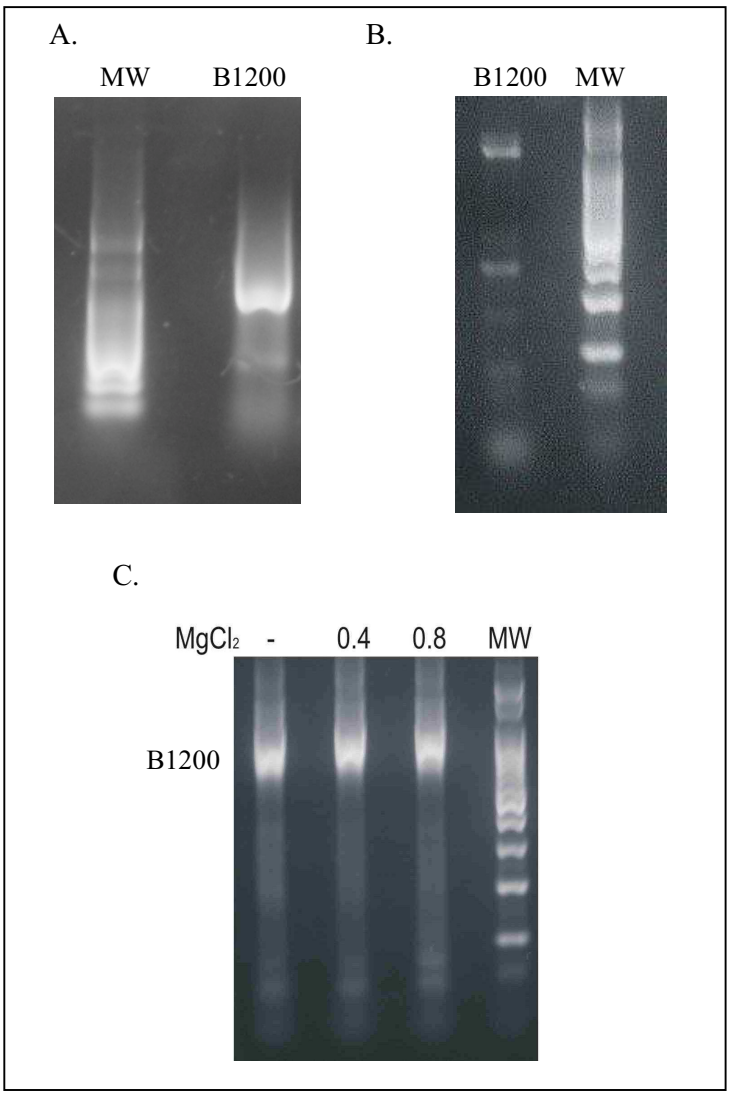


Figura IV.20. A. Amplificación de B1200 a 49°C sin el agregado extra de $MgCl_2$. **B.** Amplificación de B1200 a 51°C sin el agregado extra de $MgCl_2$. **C.** Amplificación de B1200 a 55°C sin agregado extra de $MgCl_2$ y con el agregado de 0.4 ul y 0.8 ul de $MgCl_2$ 50mM.

PARTE III

PARTE III

DETERMINAR EL NIVEL DE EXPRESIÓN DE GENES QUE CODIFICAN ENZIMAS INVOLUCRADAS EN LA VÍA DE SÍNTESIS DE ALCALOIDES

IV.9. Extracción de ARN de *A. quebracho-blanco*

Luego de poner a punto la extracción de ARN en esta especie nativa, utilizando el Método de TriZOL, se analizó la concentración y la calidad del ARN obtenido. En todas las muestras analizadas se obtuvieron concentraciones adecuadas y de óptima calidad de ARN, requeridas para la posterior etapa de trascripción reversa (RT-PCR). En la Figura III.22 se muestra un gel de agarosa al 1% donde se observa el ARN íntegro y sin contaminación de las muestras C7 y C31 de *A. quebracho-blanco*, pertenecientes a la población Pop 4-C.

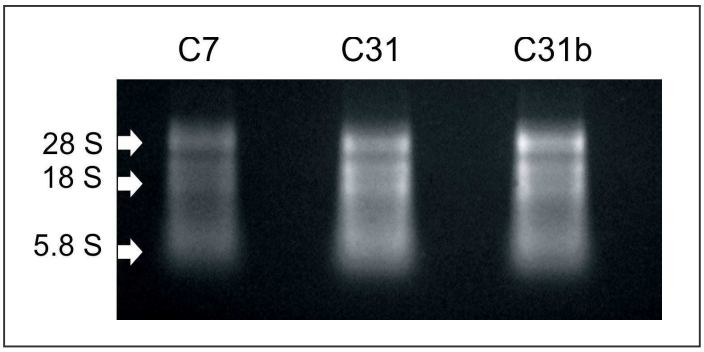


Figura IV.22. ARN de las muestras C7 y C31 de *A. quebracho-blanco*, donde se pueden observar las distintas subunidades del ARNr.

En esta figura pueden observarse las subunidades 28S, 18S y 5.8S del ARN ribosómico de *A. quebracho-blanco.* Se observan además, algunas bandas adicionales, correspondientes a los ARN de organelas como mitocondrias y cloroplastos. El número de bandas de ARN observadas en el gel luego de la extracción de ARN varía en las plantas de acuerdo a la especie y el tejido estudiado.

IV.10. Análisis por RT-PCR

IV.10.1. Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH)

Para la reacción de Transcripción Reversa (RT) de GAPDH se partió de 6 ug de ARN obtenido a partir de dos muestras de prueba (P1 y P2) para un volumen final de reacción de 20 µl. En la Figura IV.23 (carriles 1 y 2) se muestran los resultados obtenidos en la RT-PCR utilizando los *primers:* GAPDH reverse + STR reverse; y con los *primers* GAPDH forward y reverse (carriles 3 y 4).

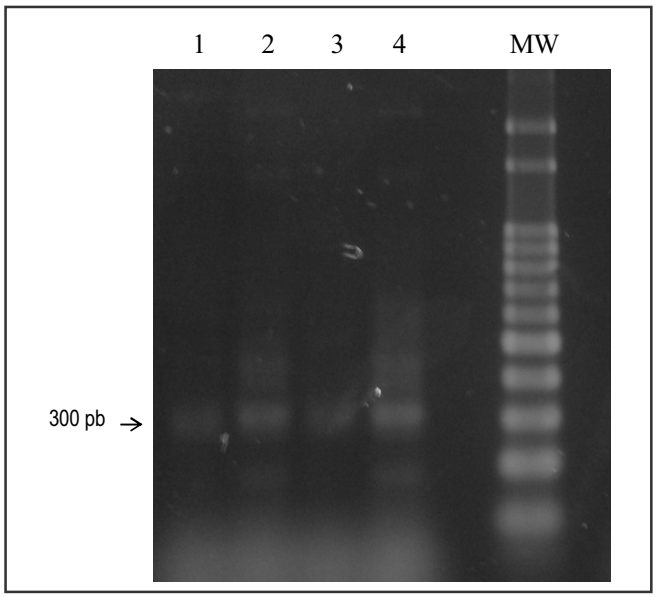


Figura IV.23. RT-PCR de GAPDH según protocolo de Plas *et al.* (2002) y Schiene *et al.* (2004). Para la etapa de PCR se utilizaron *primers* degenerados para GAPDH con T° de *annealing* de 48.5 °C. Los carriles 1 y 2 corresponden al ADNc obtenido de las muestras de prueba P1 y P2 utilizando en la etapa de RT, los *primers* degenerados reverse para STR y para GAPDH. Los carriles 3 y 4 corresponden a las mismas muestras, pero utilizando en la etapa de RT los *primers* GAPDH forward y reverse. MW: marcador de peso molecular.

IV.10.2. ***Enzimas participantes en la biosíntesis de AMIs***

Se probaron distintas condiciones de amplificación por RT-PCR de Triptófano descarboxilasa (TDC), sin embargo, pese a nuestros esfuerzos no ha sido posible obtener, el producto de amplificación de dicha enzima.

En el caso de Estrictosidina sintasa (STR), con el fin de poner a punto la amplificación, se probaron distintas condiciones de *primers*, dNTPs y $MgCl_2$. Como se observa en la Figura IV.24, bajo las distintas condiciones de $MgCl_2$ y de dNTPs se obtiene una sola banda bien definida de aproximadamente 200 pb. Si bien este producto de PCR es de menor tamaño que los descriptos para STR de otras especies, se trata de una secuencia específica de STR en *A. quebracho-blanco*.

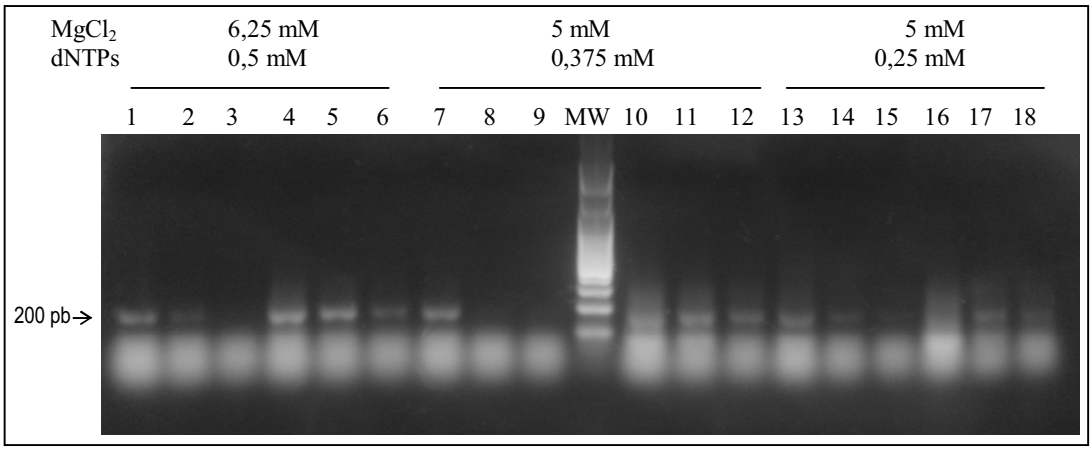


Figura IV.24. RT-PCR de STR según protocolo modificado de Yamazaki *et al.* (2003). Para la etapa de PCR se utilizaron *primers* degenerados para STR con T° de *annealing* de 42 °C. Se detallan las concentraciones utilizadas de $MgCl_2$ y de dNTPs. Los carriles 1 a 3, 7 a 9 y 13 a 15 corresponden al ADNc obtenido de BV2 utilizando 1; 0,5 o 0,25 mM de cada *primer* degenerado en la etapa de PCR. Los carriles 4 a 6, 10 a 12 y 16 a 18 corresponden a la muestra BV7, con la misma variación en la concentración de cada *primer*. MW: marcador de peso molecular.

Se realizó también la reamplificación de STR (Figura IV.25) utilizando como templado el producto obtenido en los carriles 4, 5 y 6 de la Figura IV.24 bajo las mismas condiciones utilizadas en la amplificación.

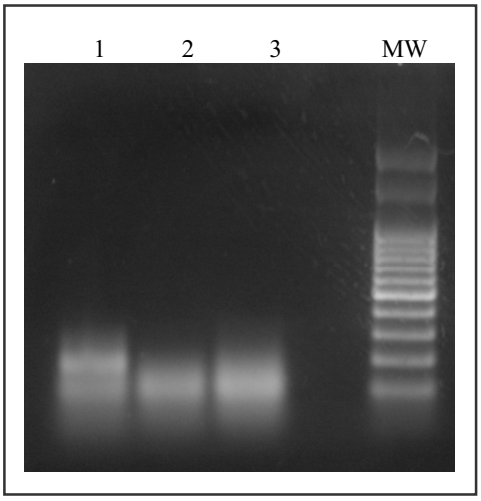


Figura IV.25. Reamplificación de STR a partir del producto de amplificación en BV7 bajo distintas condiciones de $MgCl_2$, dNTPs y *primers*. MW: marcador de peso molecular.

La Figura IV.26 muestra los productos de RT-PCR de SGD según protocolo modificado de Geerlings *et al*. (2000). En esta PCR se utilizaron distintas concentraciones de $MgCl_2$, dNTPs y *primers* forward y reverse degenerados para SGD. Los carriles 1 a 3, 7 a 9 y 13 a 15 corresponden al ADNc obtenido de BV6 utilizando 1; 0,5 o 0,2 mM de cada *primer* degenerado en la etapa de PCR. Los carriles 4 a 6, 10 a 12 y 16 a 18 corresponden a la muestra BV10, con la misma variación en la concentración de cada *primer*.

La figura IV.27 muestra la reamplificación de SGD utilizando como templado el producto obtenido en los carriles 4, 16 y 17 de la Figura IV.26 bajo las mismas condiciones utilizadas en la amplificación.

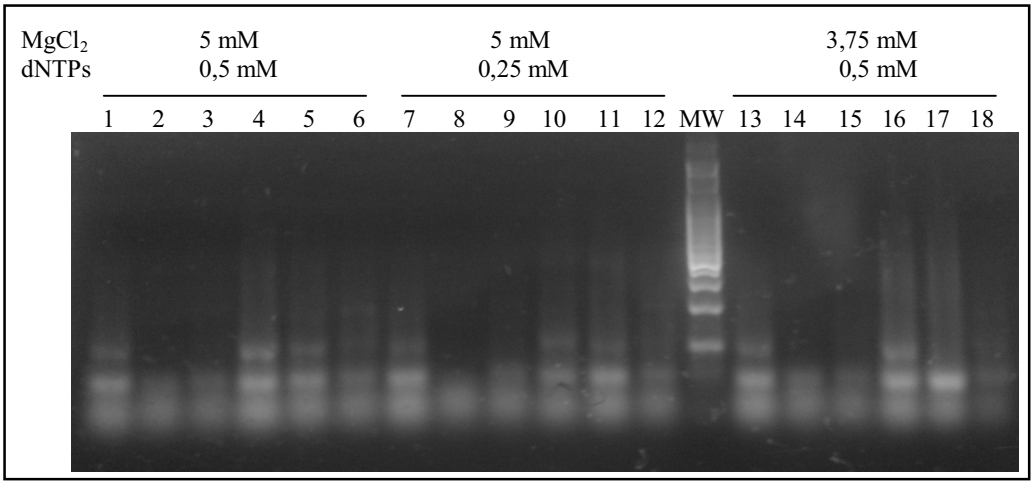


Figura IV.26. RT-PCR de SGD según protocolo modificado de Geerlings *et al.* (2000). Para la etapa de PCR se utilizaron *primers* degenerados para SGD con T° de *annealing* de 35 °C. Se detallan las concentraciones utilizadas de $MgCl_2$ y de dNTPs. Los carriles 1 a 3, 7 a 9 y 13 a 15 corresponden al ADNc obtenido de BV6 utilizando 1; 0,5 o 0,2 mM de cada *primer* degenerado en la etapa de PCR. Los carriles 4 a 6, 10 a 12 y 16 a 18 corresponden a la muestra BV10, con la misma variación en la concentración de cada *primer*. MW: marcador de peso molecular.

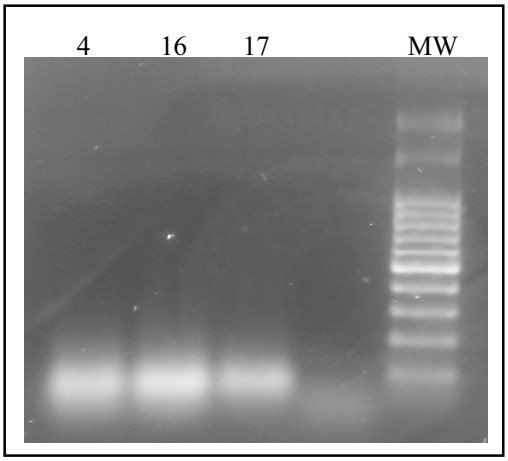
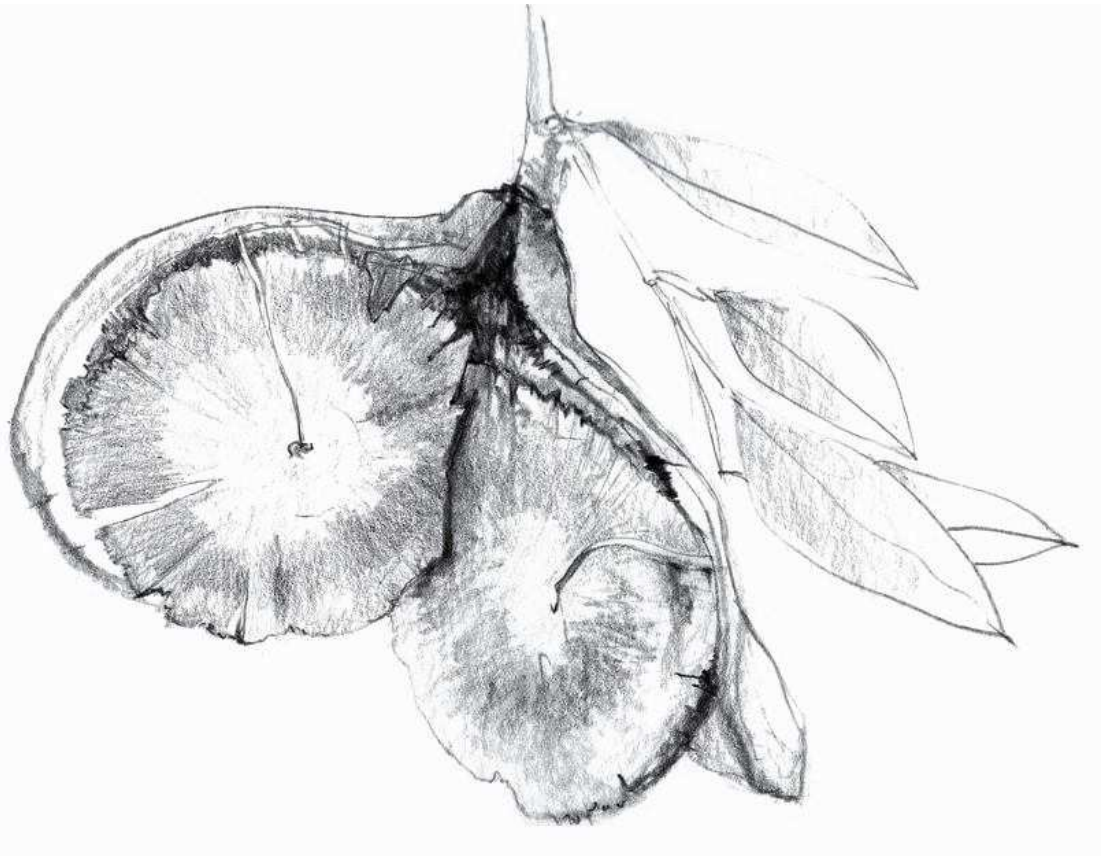


Figura IV.27: Reamplificación de SGD a partir del producto de amplificación en BV10 bajo distintas condiciones de $MgCl_2$, dNTPs y *primers*. MW: marcador de peso molecular.

Si bien los productos de amplificación obtenidos en *A. quebracho-blanco* no resultaron del mismo tamaño que los informados para otras especies, la presencia de bandas definidas sugiere una amplificación específica y por lo tanto la presencia de estas secuencias.

CAPÍTULO V



DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

V.1. DIVERSIDAD GENÉTICA DE *A. quebracho-blanco* MEDIANTE EL USO DE MARCADORES MOLECULARES RAPDS

La habilidad de una especie forestal para adaptarse a cambios ambientales, ya sean bióticos o abióticos, depende en gran parte de la variabilidad genética presente en sus poblaciones. Son las poblaciones las que se ven afectadas por diversos factores, ya sean geográficos, ecológicos, etc., provocando diferencias en las frecuencias alélicas y genotípicas. Ante un cambio ambiental, se ven modificadas las proporciones de los genes, pudiendo conferir a las poblaciones ciertas aptitudes que permiten la adaptación al nuevo ambiente. Es de destacar que si no existe dicha variación, las poblaciones forestales no podrían adaptarse a las nuevas y diferentes condiciones ambientales que ocurren a lo largo del tiempo (Ellstrand & Elam 1993; Hamrick 2004; Kramer 2007; Azpíroz Rivero *et al.* 2008).

En el presente trabajo de tesis se evaluó la diversidad genética utilizando marcadores RAPDs de poblaciones de *A. quebracho-blanco* presentes en cinco sitios experimentales, localizados en las subregiones Chaco Árido y Chaco Serrano. En la Figura V.1 se muestran los valores de precipitación media anual de cada uno de los sitios experimentales estudiados: QL (200mm); SJ (250mm); BV (600mm); C (450mm) y SG (550mm).

Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis, permitieron analizar la estructura genética poblacional que presenta *A. quebracho-blanco* en el Chaco Árido Argentino, una de las áreas prioritarias en la conservación de la biodiversidad (The Nature Conservancy 2005). El diseño del muestreo de los distintos sitios experimentales ha permitido abarcar gran parte de la distribución geográfica de la especie en el Chaco Seco. El promedio de individuos muestreados en las poblaciones de *A. quebracho-blanco* fue de 25,8; variando entre 14 y 33 según el sitio experimental. Algunos autores consideran este valor como

adecuado en estudios de diversidad genética poblacional (Nybon & Bartish 2000; Persson *et al.* 1998; Semaan & Dodd 2008). Nybom (2004) corrobora esto, en un meta-análisis realizado con marcadores moleculares, en especial, marcadores dominantes (RAPD, AFLP, ISSR), en 307 especies, donde destaca que el número promedio de plantas por población varía entre 14,5 y 18,5. Esto demuestra que el muestreo realizado en este trabajo de tesis resulta consistente para el fin de este estudio. Asimismo, el número de marcadores obtenidos tras el análisis de los patrones RAPDs de las 129 muestras de *A. quebracho-blanco*, 133 bandas RAPDs, se encuentra dentro del rango óptimo de marcadores dominantes sugeridos por Mohapatra *et al.* (2009), de 80 a 200 bandas, para una buena estimación de los parámetros de diversidad genética poblacional. Diversos estudios encontrados en la bibliografía analizan la diversidad genética mediante RAPDs en especies vegetales, utilizando un rango similar de número de *primers* a los utilizados en este estudio (Bessega *et al.* 2000; Casiva *et al.* 2000; Juarez Muñoz *et al.* 2002; Saito *et al.* 2002; Ferreyra *et al*. 2004; Andersson *et al.* 2007; Caujapé Castells *et al.* 2008; Chen *et al.* 2008; Dubreuil *et al*. 2008; Nahum *et al.* 2008; Semaan & Dodd 2008).

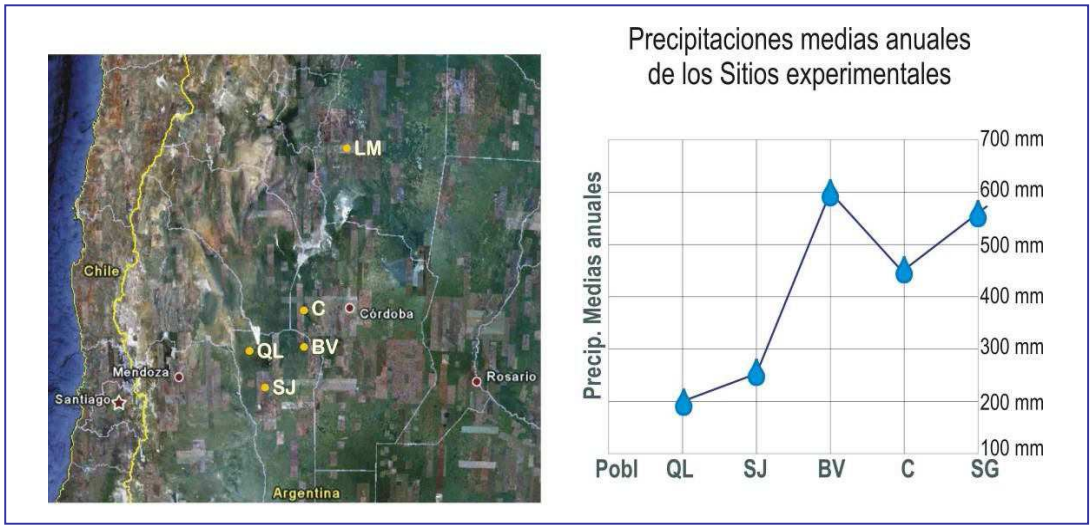


Figura V.1. Localización y valores de precipitación media anual de los sitios experimentales.

En el análisis de agrupamiento se obtuvieron dos dendrogramas, uno utilizando el Coeficiente de Asociación de Jaccard (CAJ) en el programa NTSYS 2.01e., donde puede observarse la asociación de cada uno de los 129 ejemplares; y otro basado en la distancia genética de Nei (1972), donde la asociación es realizada a nivel poblacional. Ambos agrupamientos permitieron diferenciar claramente cinco grupos poblacionales donde se

asocian los ejemplares evaluados, lo que sugiere la presencia de cinco poblaciones bien diferenciadas: G1 (Pop 1-QL), G2 (Pop 2-SJ), G3 (Pop 4-C), G4 (Pop 3-BV) y G5 (Pop 5-SG). El análisis de Coordenadas Principales confirma las asociaciones entre los ejemplares que fueron observadas en el análisis de agrupamiento.

Al analizar parámetros de diversidad genética a nivel poblacional, como el porcentaje de polimorfismo (P), la diversidad genética de Nei (h) y diversidad genética intrapoblacional estimada mediante el índice de Shannon - Weaver (Ho), se encontraron que los mayores valores corresponden a: Pop2- SJ (P = 65.4%, h = 0.214, Ho = 1.95) y Pop1-QL (P = 65.4%, h = 0.183, Ho = 1.85), las poblaciones con menor índice de precipitaciones medias anuales. Al analizar la diversidad genética de Nei (h) obtenida para la especie (h = 0,266) se comprueba que el valor obtenido es levemente mayor a la diversidad genética presente en las plantas en general (0,214), en las dicotiledóneas (0,191), en plantas perennes longevas (0,242) y en plantas que presentan fecundación cruzada (0,260) (Nybon & Bartish 2000).

Al analizar la partición de la diversidad genética en sus componentes intra e interpoblacional con el índice de Shannon-Weaver, se encontró una diversidad genética intrapoblacional de 75% e interpoblacional de 25%. Estos datos indican que la mayor parte de la diversidad se debe a diferencias entre los individuos de una misma población. Por otro lado, el análisis de los patrones RAPDs utilizando AMOVA evidenció que el 63% corresponde al componente intrapoblacional y el 37% al componente interpoblacional. La diferenciación genética entre las poblaciones fue de Φ = 0,372 ($p<0.001$) y el valor obtenido de la estimación de la diversidad de Nei (G_{ST}) para RAPDs fue de 0,348 para las cinco poblaciones. Estos resultados están en concordancia con estudios realizados en especies arbóreas perennes (Hamrick *et al.* 1992), sobre la estructura de la diversidad genética observada en plantas anuales y arbóreas (Austerlitz *et al.* 2000) y sobre la respuesta de los árboles al cambio ambiental (Hamrick 2004). Los valores obtenidos en AMOVA y el valor de Gst están en concordancia con los postulados por Nybon (2004) para estudios mediante marcadores RAPDs. De acuerdo también con nuestros resultados, algunos autores postulan que en las especies forestales perennes, la mayor parte de la variación genética es mantenida dentro de las poblaciones (Hamrick & Loveless 1989; Hamrick *et al.* 1992; Krutovskii & Bergmann 1995; Austerlitz *et al.* 2000).

Los valores de diversidad genética son comparables también con aquellos obtenidos con marcadores RAPDs para una especie forestal perteneciente al mismo género que la especie en estudio, *Aspidosperma polyneuron,* en Brasil (Domingues Torezan *et al.* 2005). En dicho estudio, esta especie presenta un 27.76% de diversidad correspondiente al componente interpoblacional. Por otro lado, Semaan & Dodd (2008) evaluaron la diversidad genética de poblaciones naturales de *Cedrus libani*, concluyendo a través de datos obtenidos por marcadores RAPDs, que la especie presenta una baja diversidad genética interpoblacional. Estos autores, además, destacan la existencia de una fuerte correlación entre la variabilidad genética revelada por los marcadores RAPDs con genes implicados en la respuesta al estrés hídrico.

Tanto el análisis de agrupamiento, como en el análisis de Coordenadas Principales sugieren la presencia de dos subregiones, asociando por un lado los sitios experimentales de menor precipitación media anual (Pop 1-QL y Pop 2-SJ) y por otro, aquellos con mayor precipitación (Pop 3-BV, Pop 4-C, Pop 5-SG). El análisis de la Varianza Molecular teniendo en cuenta estas dos posibles subregiones, evidencia que la proporción de la variabilidad total atribuible a la diferenciación entre las subregiones es del 11%.

A partir del valor de G_{ST} se estimó el flujo génico (Nm), que se refiere al movimiento de individuos entre las poblaciones, donde el Nm entre todas las poblaciones es de 0,4684, lo cual indica que menos de un individuo está migrando por generación. Sin embargo, cuando se analizó el flujo de genes dentro de cada subregión, este resultó mayor al obtenido entre todas las poblaciones estudiadas (SRI Nm= 0,8631 y SRII Nm= 0,6735). Pese al predominio de diversidad genética intrapoblacional, los niveles de diferenciación genética son altamente significativos a todos los niveles estudiados (valores de p menores a 0,001). Por otro lado, si consideramos que un $\Phi = 0.20$ corresponde a sólo un migrante efectivo entre poblaciones por generación, el valor de $\Phi = 0,11$ resulta bastante alto. De este modo, se demuestran ciertas restricciones en el flujo de genes, debido, posiblemente, al aislamiento espacial entre las poblaciones. Confirma esto la correlación obtenida entre la distancia genética y geográfica en el análisis mediante el Test de Mantel.

Según Zaghloul *et al.* (2006) el nivel y distribución de la diversidad genética en cualquier especie vegetal es influenciada por interacciones entre al menos tres factores: 1. Condiciones abióticas, incluyendo clima, características del hábitat y del suelo; 2. Interacciones bióticas como competición, simbiosis, parasitismo y predación; y 3.

Características de la especie como tamaño poblacional, sistema de reproducción, flujo génico y mecanismos de dispersión. Hamrick & Nason (1996) consideran que los patrones y niveles de flujo génico vía polen y dispersión de semillas son los mayores determinantes en el establecimiento de la estructura genética. Por otra parte, de acuerdo a Hamrick & Godt (1996 b), la distribución de la diversidad genética está fuertemente relacionada con caracteres de historia de vida, particularmente con los sistemas reproductivos y la dispersión, para ello el flujo génico también puede ser obstruido por barreras físicas. En general, estas barreras afectan también a los polinizadores y a la dispersión de las semillas. Al respecto, el nivel de flujo génico vía polen depende específicamente, de la capacidad migratoria del polinizador.

La evidencia nos indica que *A. quebracho-blanco* es polinizado en particular por algunos insectos, lepidópteros (*Noctuidea, Pyraloidea*) (Lin & Bernardello 1999). Estos insectos son atraídos a las flores por "engaño", donde pasan de rama en rama y de árbol en árbol, sin ninguna recompensa (Lin & Bernardello 1999). Estos autores además determinaron que la especie es autocompatible, con presencia de abundantes flores protándricas (en las que la liberación del polen ocurre antes de que el estigma llegue a ser receptivo), de posición pendular u horizontal, factores estos que contribuyen a prevenir la autopolinización. De este modo, la autogamia no ocurre espontáneamente, viéndose favorecida la xenogamia (polinización entre flores de distintos individuos de la misma especie), siendo posible también, la geitonogamia (polinización entre flores distintas de un mismo individuo).

Genéticamente hablando, la geitonogamia es equivalente a la autogamia, mecanismo que incrementa la homocigosis, reduciendo la variabilidad genética. La xenogamia, en cambio, ocurre en beneficio de las poblaciones al producir mayor variabilidad genotípica, creando nuevas combinaciones alélicas en cada generación (Wendt *et al.* 2001; Ramirez 2005). Por otro lado, según Schiestl (2005) la polinización por engaño se lleva a cabo únicamente por insectos "sin experiencia" que aún no han "aprendido" a evitar las flores no gratificantes. Los polinizadores luego de pasar de rama en rama, sin ninguna recompensa, contribuyen a la dispersión del polen a mayores distancias que en las especies gratificantes. De este modo, el nivel de diferenciación genética entre las poblaciones, se supone que debe ser menor en estas especies que en aquellas que brindan alguna

recompensa (Alexandersson & Ågren 2000), incrementando de este modo los niveles de variabilidad genética entre las poblaciones.

En *A. quebracho-blanco*, las semillas son dispersadas por el viento (Barchuk & Díaz 2000; Barberis *et al.* 2002). Al respecto, Alexandersson & Ågren (2000), postulan que aquellas especies que presentan fecundación cruzada y una amplia dispersión de semillas y polen, se caracterizan por bajos coeficientes de endogamia y por una limitada diferenciación poblacional en *loci* neutrales. Sin embargo, la fragmentación de los bosques, la reducción de las poblaciones, la tala indiscriminada, los incendios pueden provocar barreras que afecten el nivel de diferenciación genética de una población. Por lo que con el transcurso del tiempo, las poblaciones se vuelven cada vez más aisladas, y el tránsito de los polinizadores es muy probable que sea cada vez más difícil.

Los efectos más inmediatos de la fragmentación en la composición genética de las poblaciones de plantas dependen de dos factores: el tamaño efectivo de la población dentro de los fragmentos y los patrones de la variabilidad genética de las poblaciones originales anteriores a la fragmentación (Nason *et al*. 1997; Hamrick 2004, Aguilar *et al.* 2008). Como resultado inmediato, la variación genética de las poblaciones se reduce debido a los cuellos de botella genéticos, es decir, una menor proporción de loci polimórficos y una reducción en el número de alelos por locus se espera dentro de los fragmentos (Nei *et al.* 1975; Ellstrand & Elam 1993; Young *et al.* 1996). Si las condiciones de fragmentación persisten en generaciones sucesivas, se espera una disminución en la heterocigosidad y un aumento de la endogamia.

Hamrick (2004) postula que la combinación de la longevidad, la alta diversidad genética dentro de la población y altas tasas de flujo de polen, hacen a las especies forestales especialmente resistentes a la extinción y la pérdida de la diversidad genética durante las condiciones ambientales cambiantes. Según Molnár *et al*. (2012), las especies longevas muestran un mayor grado de plasticidad fenotípica que les permite resistir mejor las condiciones ambientales asociadas con el cambio climático en comparación con las especies de vida más corta. De acuerdo con Aguilar *et al*. (2008) la capacidad de las plantas de reproducirse por clones, a través de la propagación vegetativa, puede amortiguar los efectos genéticos de la fragmentación. Según estos autores, sería una consecuencia de retrasar el tiempo entre generaciones. La resiliencia de *A. quebracho-blanco* podría

depender, entonces, de su capacidad para producir con éxito plántulas a partir de semillas o de regenerarse por sí mismo por rebrote de la raíz (Barchuk & Díaz 1999).

Apoyados en las consideraciones de Zaghloul *et al.* (2006) y Hamrick & Nason (1996) nuestros resultados evidencian que la combinación de las características ecológicas de la especie, junto con las características climáticas del lugar donde se desarrolla la población y los sistemas de reproducción son, en este caso, los factores que estarían influyendo en la diversidad genética observada. La cantidad de flujo genético entre las poblaciones remanentes es un elemento clave que en última instancia determinará las consecuencias genéticas de la fragmentación del hábitat (Sork *et al.* 1999; Frankham *et al.* 2002; Hamrick 2004; Sork & Smouse 2006). Los niveles moderados o incluso relativamente bajos de flujo de genes a través del polen o semillas entre poblaciones fragmentadas pueden aliviar significativamente la pérdida de diversidad genética mediante la prevención de los efectos de la deriva genética (por ejemplo Sork *et al.* 1999; Couvet 2002; Aguilar *et al.* 2008).

La información obtenida en este estudio, puede ser de utilidad como base de estrategias de conservación de esta especie en Chaco Seco, mediante la identificación de áreas prioritarias para la conservación de la especie. Asimismo denota la utilidad de los marcadores RAPDs en el análisis de la diversidad genética intra e interpoblacional de recursos genéticos forestales de *A. quebracho-blanco*.

V.1.1. Implicaciones para la conservación

La conservación de la diversidad biológica es motivada en primera instancia por el deseo de proteger un bien de valor multifacético para las generaciones actuales y futuras, valor que comprende los aspectos: ecológico, genético, social, económico, científico, educativo, cultural, recreativo y estético. La conservación no siempre es compatible con el desarrollo sostenible, y en este sentido el problema relacionado al manejo es el mantenimiento del nivel de diversidad que garantice la resiliencia (rápido retorno a las condiciones normales después de un disturbio) del ecosistema, además del principal objetivo: implementar estrategias de conservación (Rodriguez *et al.* 2005).

El conocimiento de la diversidad genética dentro y entre las poblaciones de especies amenazadas juega un papel muy importante en la formulación de estrategias apropiadas para su manejo y conservación.

V.1.1.1. Conservación *in situ*: las áreas protegidas como unidades de conservación

El establecimiento de las unidades de conservación puede ayudarnos en la toma de mejores decisiones para la conservación de la diversidad genética de una especie. Las unidades de conservación son: "Unidades evolutivamente significativas, unidades de manejo o cualquier unidad geográfica que los investigadores consideren importante conservar" (Manel *et al.* 2003). En cada una de las unidades de conservación está representada una fracción de la diversidad genética de una especie y cada una de estas unidades de conservación representa un centro de diversidad genética.

Por otro lado, se debe tratar de conservar la variabilidad genética de cada una de estas unidades de conservación. Para ello, debe mantenerse actualizado el monitoreo de la diversidad genética de cada población dentro de cada unidad de conservación. En las decisiones respecto a la conservación de la diversidad genética, se debe priorizar a aquellas poblaciones con mayor diversidad genética, pues esto permitirá mantener un mayor potencial evolutivo que permita la subsistencia de la especie. Adicionalmente, se debe procurar la conservación del ambiente, ya que la conservación del ambiente junto con el mantenimiento de la diversidad genética contribuirán a la conservación de la diversidad morfológica de la especie.

Nuestros resultados indican que *A. quebracho-blanco* posee altos niveles de diversidad genética intrapoblacional en el Chaco Seco. Consecuentemente, la diversidad genética interpoblacional es moderadamente baja en esta especie, es decir, las poblaciones no se encuentran del todo aisladas entre sí, a pesar de la gran distancia geográfica que las separa. Esto justifica que la estrategia de conservación involucre a las cinco poblaciones, con especial atención en las poblaciones que presentan mayor diversidad intrapoblacional, Pop1-QL y Pop2-SJ. Afortunadamente, Pop1-QL es una Reserva Natural Provincial, pero Pop2-SJ no presenta ninguna protección formal. En este sentido, nuestros resultados

evidencian que en este último sitio se debe aumentar el estado de conservación. Sin embargo, la conservación en áreas protegidas no es suficiente. Es urgente aplicar una gestión forestal sostenible que proteja a las poblaciones en campos privados.

Es posible el desarrollo de las prácticas de gestión en la conservación de *A. quebracho-blanco*. Se recomienda la conservación *in situ* ya que dará lugar a la conservación efectiva de los recursos genéticos y la evolución de los recursos en ambientes naturales. Las poblaciones de *A. quebracho-blanco* tienen una alta capacidad de sobrevivir ante cambios adversos, sin embargo el número de plantas adultas está siendo reducido debido, principalmente, a cambios en el uso del suelo y otras perturbaciones, por lo que es necesario iniciar una estrategia activa para la conservación de la especie. Resulta necesario, por lo tanto, la conservación de una proporción de los individuos maduros en las poblaciones para la protección de la aptitud reproductiva y el potencial evolutivo de las especies (Cruse-Sanders & Hamrick 2004).

Por último, esperamos que los estudios genéticos y ecológicos sobre esta valiosa especie maderera comiencen a orientar las prácticas actuales de gestión y ayudar a tomar las medidas políticas a nivel regional, lo cual demuestra cómo el conocimiento puede traducirse en planes eficaces de conservación.

V.2. CARACTERIZACIÓN POR SECUENCIACIÓN DE BANDAS OBTENIDAS COMO MARCADORES RAPDS

Hasta el presente y pese a la importancia de las especies forestales en la conservación de los ecosistemas, pocas son las especies de las cuales se ha secuenciado parte de su genoma. El organismo modelo de especies vegetales, *A. thaliana* es una de las pocas especies vegetales de las cuales se conoce el genoma completo. La mayoría de los estudios en especies forestales se han realizado en especies de importancia económica como las pertenecientes a los géneros *Populus, Pinus, Quercus y Fagus.*

A. quebracho-blanco es una especie forestal nativa de nuestro país que presenta numerosos mecanismos de tolerancia o adaptación a los ambientes a lo largo de su amplia distribución, como ya fuera señalado. Dada la importancia de esta especie en la ecorregión del Chaco Árido, nos propusimos identificar algunas secuencias para la especie que nos

ocupa, a partir de marcadores RAPDs obtenidos en el estudio de diversidad genética. De este modo se han secuenciado dos marcadores RAPDs, identificados como B_{1200} y B_{600}.

Con respecto al marcador B_{1200}, se encontró una homología del orden del 86% con numerosos miembros de la superfamilia del "Sistema de dos componentes", resultando por tanto de gran interés para la profundización y el avance del conocimiento en relación a los mecanismos de transducción de señales en especies forestales. La fosforilación de proteínas es un mecanismo clave en la transducción de señales tanto en eucariotas como en procariotas. Estos procesos son llevados a cabo por proteínas quinasas, que pueden clasificarse en tres grupos principales: las serina-treonina quinasas, las tirosina quinasas y las histidina quinasas. Este último grupo, las histidina quinasas (HK), juegan un importante rol en la transducción de señales extracelulares de bacterias, incluyendo factores quimiotácticos, cambios en la osmolaridad y deficiencia de nutrientes (Stephenson & Hoch 2002; Scott *et al.* 2013)

En eucariotas superiores, el sistema histidina quinasa es exclusivo de plantas, aunque recientemente se ha demostrado su presencia en mamíferos (Attwood 2013). Este sistema media la transferencia de un grupo fosfato entre un residuo His y un residuo Asp, comúnmente llamado "Sistema de dos componentes". El *primer componente* de este sistema es un *receptor* de membrana que contiene un dominio periplasmático de unión al ligando, un dominio transmembrana y un dominio C-terminal con actividad quinasa. Cuando el receptor es activado por la unión del ligando, se autofosforila transfiriendo un grupo ortofosfato a un residuo de histidina con consumo de ATP. El receptor activo es un homodímero en el cual cada monómero fosforila al otro. El *segundo componente*, un *regulador de respuesta*, es activado cuando el primer componente transfiere un grupo fosfato desde su residuo histidina a un residuo aspartato conservado. En su forma activa, fosforilada, el regulador de respuesta controla un amplio rango de actividades celulares.

En algunos "Sistemas de dos componentes", los dominios HK y el dominio de unión al ligando están localizados en proteínas distintas, permitiendo que varios ligandos activen la misma quinasa. Otra variación es un sistema híbrido de quinasa, donde el regulador de respuesta está fusionado a la HK. En algunos casos, el sistema incluye algunos motivos adicionales, constituyendo un sistema más complejo. Estos dominios adicionales son llamados *dominios HPt* (Histidine-containing phosphotransfer domain). El análisis de homología de secuencias del marcador B1200 evidenció que pertenece al grupo de híbrido

de quinasa, donde se identificaron los dos dominios y que, además un motivo adicional del tipo *HPt*.

En *A. thaliana*, el "Sistema de dos componentes" está formado por proteínas del tipo de His-quinasas híbridas (AHKs), proteínas que contienen el dominio *HPt* (AHPs) y los reguladores de respuesta (ARRs) (Figura V.2). En esta especie el "Sistema de dos componentes" es un sistema de familias multigénicas (Horák *et al.* 2008). Cuando se comparó la secuencia en estudio con el banco de proteínas de la especie de referencia, se encontró para el marcador B_{1200} mayor homología con el R*egulador de Respuesta 22* de *A. thaliana* (ARR22), con respecto a otras proteínas del "Sistema de dos componentes" de esta especie modelo.

En plantas el "Sistema de dos componentes" juega un rol importante en la respuesta a hormonas como citoquinas y etileno (Figura V.3) (Hutchison *et al.* 2006; Cho & Yoo 2007; Mason *et al.* 2005; Riefler *et al.* 2006; Shi & Rashotte 2012; Veerabagu *et al.* 2012; Ruszkowski *et al.* 2013), a nutrientes (Franco-Zorrilla *et al*. 2002; Sakakibara *et al.* 2006), al estrés osmótico, por frío o por salinidad (Wohlbach *et al*. 2008; Karan *et al.* 2009; Jeon & Kim 2013), a la luz (Mira-Rodado *et al*. 2007; To *et al.* 2004) y al cierre de estomas mediado por etileno y H_2O_2 (Desikan *et al.* 2005; Desikan *et al.* 2006). Otras funciones no menos importantes de los componentes de este sistema son el mantenimiento del reloj circadiano (Mizuno 2005; Salome *et al.* 2006) y la participación en numerosos procesos de regulación del desarrollo (Pischke *et al.* 2002; Mähönen *et al.* 2006; Yokoyama *et al.* 2007). El marcador B1200 (1050pb) comparte con el receptor de etileno el dominio H, el dominio D y el *HPt*, lo cual resulta de gran interés si tomamos en consideración su papel potencial en la regulación osmótica.

La obtención de múltiples bandas aún cuando se realizó la amplificación con una elevada temperatura de hibridación de los *primers*, sugiere que se trataría de un sistema de familias multigénicas.

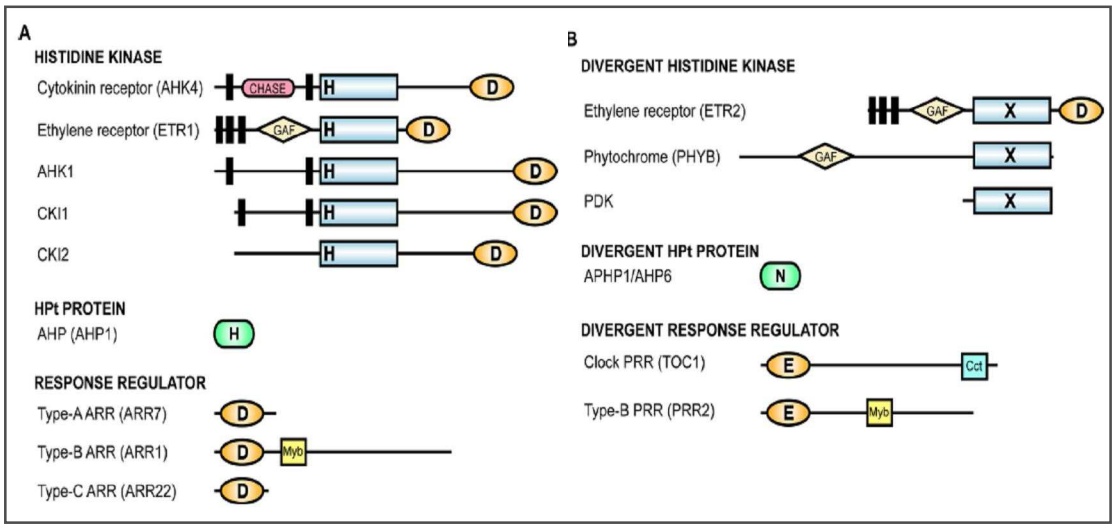


Figura V.2. Dominios de algunas proteínas pertenecientes al Sistema de dos componentes en *A. thaliana*, donde H (residuo Histidina) y D (residuo Aspártico), X (dominio similar a HK). (Extraído de: Schaller *et al.* 2008).

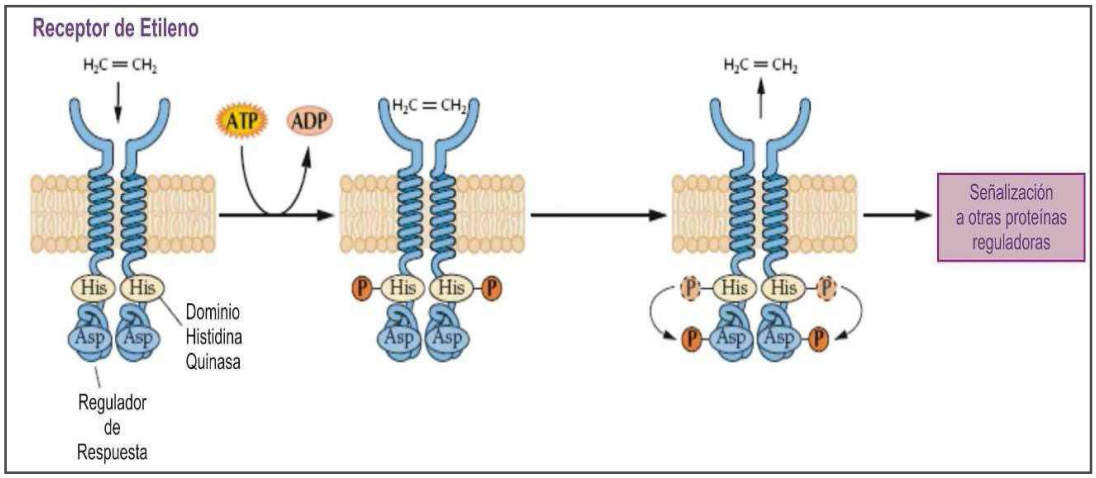


Figura V.3. Receptor de Etileno, una Histidina quinasa perteneciente al Sistema de dos componentes tipo híbrido. Modificada de Trewavas 2000.

El marcador B600, pese a no poseer homología con secuencias conocidas en plantas, posee conservado el dominio Acetil transferasa. Esta familia incluye un gran número de enzimas de gran importancia en el metabolismo celular. Algunos miembros de esta familia participan por ejemplo, en la biosíntesis de metabolitos secundarios como alcaloides (D'Auria 2006) y suberina (Franke *et al.* 2009). La ubicuidad de la secuencia en todas las

muestras analizadas sugiere que se trata de una proteína conservada y por lo tanto con una función básica en la especie.

En síntesis, la importancia del presente estudio radica en que la secuenciación de marcadores RAPDs permitió identificar secuencias correspondientes a genes no descriptos hasta el presente en *A. quebracho-blanco* como tampoco en otras especies forestales. Se identificaron dos secuencias, una perteneciente al "Sistema de dos componentes" y la otra relacionada a una proteína con actividad acetiltransferasa. El estudio del marcador B1200 arrojó una secuencia de 464 aa perteneciente a la familia de HK híbrida, con dominios conservados y con una presencia variable en relación al nivel de precipitaciones de los sitios estudiados.

V.3. DETERMINAR EL NIVEL DE EXPRESIÓN DE GENES QUE CODIFICAN ENZIMAS INVOLUCRADAS EN LA VÍA DE SÍNTESIS DE ALCALOIDES

De acuerdo a los resultados obtenidos, el producto de RT-PCR para el gen de control interno GAPDH aparece como una única banda, aunque de menor peso molecular al indicado en la bibliografía para otras especies.

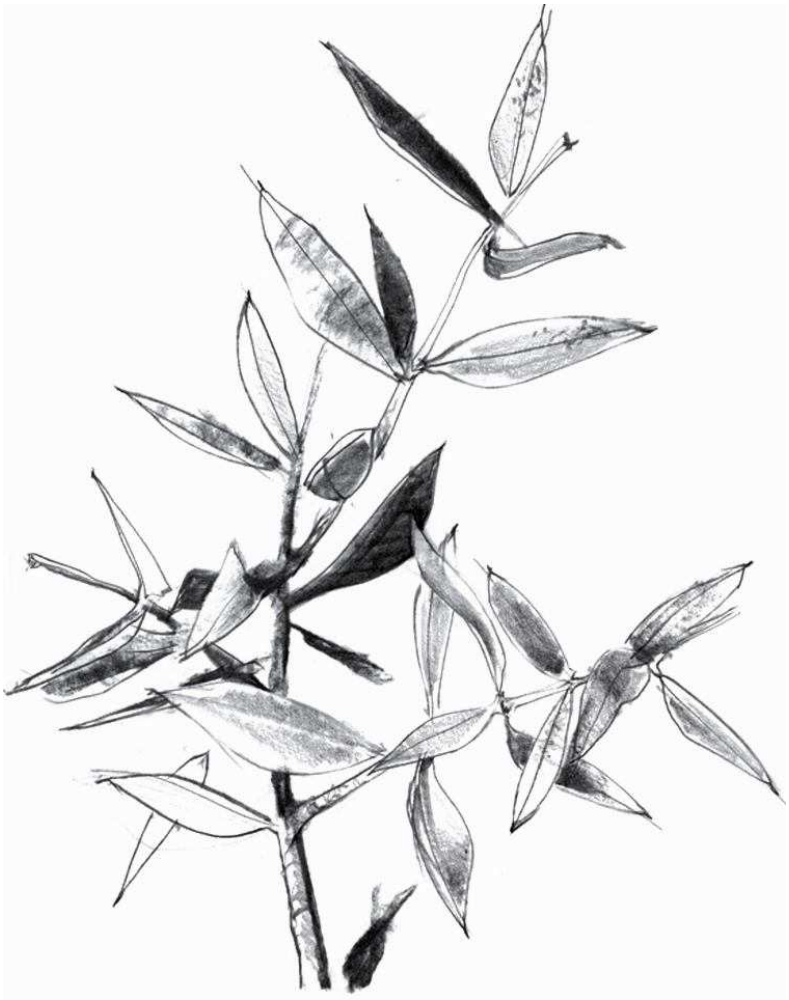
En el caso de las enzimas Estrictosidina sintasa (STR) y Estrictosidina β-D-glucosidasa (SGD) se obtiene un patrón de amplificación de una o unas pocas bandas, bien definidas en *A. quebracho blanco*, una especie de la cual no se conoce ninguna secuencia de su genoma. Si bien los productos de amplificación obtenidos para GAPDH, STR y SGD no son del mismo tamaño que los informados para otras especies productoras de AMIs, como *C. roseus* y *R. serpentina* (Geerlings *et al.* 2000; Yamazaki *et al.* 2003), la presencia de bandas definidas sugiere una amplificación específica y por lo tanto la presencia de estas secuencias. No debemos perder de vista que los *primers* empleados son degenerados. Es necesario tener presente que los procesos adaptativos/evolutivos podrían dar lugar a modificaciones en la secuencia y por lo tanto

producir diferencias en el genoma de *A. quebracho-blanco* respecto de las especies usadas como referencia.

Algunos estudios sobre plantas productoras de alcaloides sugieren que la biosíntesis y acumulación de alcaloides es un proceso altamente regulado, que incluye controles a nivel celular, tisular y de desarrollo e incluso según las condiciones medio-ambientales (Verpoorte *et al.* 1998; De Luca & St. Pierre 2000; Kutchan 2005). Además, estudios previos usando hibridación *in situ* e inmunolocalización han demostrado la ubicación celular específica de transcriptos y proteínas de algunas de las enzimas de dicha vía metabólica (St-Pierre *et al.* 1999). Góngora-Castillo *et al*. (2012) evaluaron la expresión de los genes implicados en la biosíntesis de los AMIs en tres plantas conocidas por sus propiedades medicinales, *C. roseus, R.serpentina* y *Camptotheca acuminata*. Estos autores estudian la expresión diferencial de estos genes, bajo distintos tratamientos con hormonas o mediante elicitación.

Si bien los resultados obtenidos en este objetivo no fueron óptimos, se logró amplificar secuencias específicas de STR y SGD en *A. quebracho-blanco*. A fin de avanzar en la investigación a futuro se intentará amplificar estas secuencias utilizando distintos sets de *primers*, diseñados a partir de secuencias presentes en otras especies, mediante RT-PCR convencional o utilizando Nested-PCR.

CAPÍTULO VI



CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

Las conclusiones de los resultados obtenidos del presente estudio para determinar la diversidad genética en cinco poblaciones naturales de *A. quebracho-blanco* Schltdl. en el Chaco Seco argentino, subregiones Chaco Árido y Chaco Serrano, son las siguientes:

1. El análisis de la diversidad genética utilizando marcadores RAPDs en cinco sitios experimentales localizados en las subregiones Chaco Árido y Chaco Serrano, con distintas características climáticas y geomorfológicas; permite conocer la estructura genética poblacional de la especie en el Chaco Seco argentino.

2. A nivel poblacional, se analizaron parámetros como porcentaje de polimorfismo (P), diversidad genética de Nei (*h*) y diversidad genética intrapoblacional estimada con el índice de Shannon-Weaver (*Ho*). Los mayores valores fueron detectados en: SJ (P = 65,4%; h = 0,214; Ho = 1,95) y QL (P = 65,4%, h = 0,183, Ho = 1,85), las poblaciones con menor índice de precipitaciones medias anuales.

3. Se encontró una diversidad genética intrapoblacional de 75% e interpoblacional de 25% al ser analizadas con el índice de Shannon-Weaver. El análisis de los patrones RAPDs utilizando AMOVA evidenció que el 63% corresponde al componente intrapoblacional y el 37% al componente interpoblacional. La diferenciación genética entre las poblaciones fue de Φ = 0,372 (p <0,001) y el valor obtenido de la estimación de la diversidad de Nei (G_{ST}) para RAPDs fue de 0,348 para las cinco poblaciones. Al analizar las poblaciones agrupadas en dos subregiones SRI y SRII, los valores de G_{ST} obtenidos fueron 0,2246 y 0,2707, respectivamente.

4. El flujo génico (Nm= 0,935) presente entre las poblaciones, indica que menos de un individuo está migrando por generación. Sin embargo, cuando se analizó el flujo de genes dentro de cada subregión los valores obtenidos (SRI Nm= 0,8631 y SRII Nm= 0,6735) resultan comparables con aquellos publicados en general para las especies forestales.

5. El dendrograma obtenido utilizando UPGMA permite diferenciar claramente cinco grupos, lo que sugiere la presencia de cinco poblaciones. El análisis de Coordenadas

Principales confirma las asociaciones entre los ejemplares que fueron observadas en el análisis de agrupamiento.

6. La información obtenida en este estudio, puede ser de utilidad como base de estrategias de conservación de esta especie en Chaco Seco, mediante la identificación de áreas prioritarias para la conservación de la especie. Asimismo denota la utilidad de los marcadores RAPDs en el análisis de la diversidad genética intra e interpoblacional de recursos genéticos forestales de *A. quebracho-blanco*.

7. Los grupos poblacionales estudiados en este trabajo albergan una interesante diversidad genética, por lo cual son dos áreas prioritarias para la conservación de los recursos genéticos forestales de la especie en el Chaco Seco argentino.

8. El marcador B1200, presentó homología con miembros de la superfamilia del "Sistema de dos componentes", resultando por tanto de gran interés para la profundización y el avance del conocimiento en relación a los mecanismos de transducción de señales en especies forestales.

9. El marcador B600 pese a no poseer homología con secuencias conocidas en plantas, posee conservado el dominio Acetil transferasa.

10. Los resultados obtenidos del estudio a nivel de transcriptos STR y SGD, sugieren la presencia de bandas de estas secuencias en *A. quebracho-blanco*.

CAPÍTULO VII

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

AGUILAR R, QUESADA M, ASHWORTH L, HERRERIAS-DIEGO Y & LOBO J. 2008. Genetic consequences of habitat fragmentation in plant populations: susceptible signals in plant traits and methodological approaches. Molecular Ecology 17: 5177-5188.

ALDRICH PR & HAMRICK JL. 1998. Reproductive Dominance of Pasture Trees in a Fragmented Tropical Forest Mosaic. Science 281: 103-105.

ALEXANDERSSON R & ÅGREN J. 2000. Genetic structure in the non-rewarding, bumblebee-pollinated orchid *Calypso bulbosa*. Heredity 85: 401-409.

ALLENDORF FW, HOHENLOHE PA & LUIKART G. 2010. Genomics and the Future of Conservation Genetic. Nature Reviews Genetics 11: 679-709.

ALLENDORF FW & LUIKART G. 2007. Conservation and the Genetics of Populations. Blackwell Publishing, Australia.

ALLNUTT TR, NEWTON AC, PREMOLI AC & LARA A. 2003. Genetic variation in the threatened South American conifer *Pilgerodendron uviferum* (Cupressaceae), detected using RAPD markers. Biological Conservation 114: 245-253.

ALMANDOZ GL. 1993. "Geología del Bajo de Véliz" Provincia de San Luis. Trabajo Final de Licenciatura. Facultad de Ciencias Físico, Matemáticas y Naturales. Universidad Nacional de San Luis.

ALONSO VC. 1999. Aplicación de RAPD para el diagnóstico y estudio molecular de *Leishmania braziliensis*. Tesis Doctoral. Universidad La Laguna, España.

ALZUGARAY C, CARNEVALE NJ, SALINAS AR & PIOLI R. 2006. Calidad de semillas de *Aspidosperma quebracho-blanco* Schlecht. Quebracho 13: 26-35.

AMIRJANI MR. 2013. Effects of drought stress on the alkaloid contents and growth parameters of *Catharanthus roseus*. ARPN Journal of Agricultural and Biological Science 8 (11): 745-750.

ANAYA LANG AL. 2003. Ecología Química. Primera Edición Ed: Plaza y Vakdeés, S.A. de C.V México. ISBN: 970-722-113-5.

ANDERSSON MS, SCHULTZE-KRAFT R, PETERS M, DUQUE MC & GALLEGO G. 2007. Extent and structure of genetic diversity in a collection of the tropical multipurpose shrub legume *Cratylia argentea* (Desv.) O. Kuntze as revealed by RAPD markers. Electronic Journal of Biotechnology 10 (3): 386-399.

ANTONOVICS J. 2006. Evolution in a closely adjancent plant population X: long term persistence of pre reproductive isolation at a mine boundary. Heredity 97: 33-37.

ARAUJO P, ITURRE MC, ACOSTA VH & RENOLFI RF. 2008. Estructura del bosque de La María EEA INTA Santiago del Estero. Quebracho 16: 5-19.

ARIAS TOLEDO B, TRILLO C & GRILLI M. 2010. Uso de plantas medicinales en relación al estado de conservación del bosque en Córdoba, Argentina. Ecología Austral 20: 235-246.

ATLAS DE LOS BOSQUES NATIVOS ARGENTINOS 2003, Proyecto Bosques Nativos y Áreas Protegidas BIRF 4085-AR, Dirección de Bosques, Secretaría de Ambiente y Desarrollo Sustentable.

ATTWOOD PV. 2013. Histidine kinases from bacteria to humans. Biochemical Society Transactions 41 (4): 1023-1028.

AUSTERLITZ F, MARIETTE S, MACHON N, GOUYON PH & GODELLE B. 2000. Effects of colonization Processes on Genetic Diversity Differences Between Annual Plants and Tree Species. Genetics 154: 1309-1321.

AUSUBEL FM, BRENT R, KINGSTON RE, MOORE DD, SEIDMAN SJ, SMITH JA & STRUHL K. 1999. Short protocols in molecular biology. 4th ed. Wiley, USA. ISBN 0-471-32938-X.

AZPÍROZ RIVERO HS, CÓRDOVA AGUILAR AI, MARTÍNEZ RUIZ R, ROJO MARTÍNEZ GE & BERNAL LUGO IO. 2008. Importancia de los marcadores moleculares en el reconocimiento de la diversidad genética forestal. En: Avances de investigación forestal y desarrollo sustentable 1ª edición, México. ISBN: 968-839-545-5.

BAAS WJ. 1989. Causes and Consequenses of variation in growth rate and productivity of higher plants. En: Lambers H, Cambridge ML, Konings H & Pons TL (eds): SPB Academic Publishing. The Hague. pp 313-340.

BANDONI AL, COUSSIO JD & RONDINA RV. 1999. Plantas medicinales o tóxicas Argentinas (Base de datos). 3ª edición. Acta Farmacéutica Bonaerense 18: 65-68.

BAÑARES Á, CARQUÉ E, DURBÁN M, GONZÁLEZ MA, MARRERO MV & SOSA P. 2002. Biología de la Conservación de la Flora Amenazada del Parque Nacional del Teide (Islas Canarias). Organismo Autónomo Parques Nacionales, España.

BARBERIS IM, BATISTA WB, PIRE EF, LEWIS JP & LEÓN RJC. 2002. Woody population distribution and environmental heterogeneity in a Chaco forest, Argentina. Journal of Vegetation Science 13: 607-614.

BARCHUK AH & DÍAZ MP. 1999. Regeneration and structure of *Aspidosperma quebracho-blanco Schl.* in the Arid Chaco (Córdoba, Argentina). Forest Ecology and Management 118: 31-36.

BARCHUCK AH & DÍAZ MP. 2000. Vigor de crecimiento y supervivencia de plantaciones de *Aspidosperma quebracho-blanco* y de *Prosopis chilensis* en el Chaco Árido. Quebracho 8: 17-29.

BARCHUK AH, DÍAZ MP, CASANOVES F, BALZARINI MG & KARLIN UO. 1998. Experimental study on survival rates in two arboreal species from the Argentinean Dry Chaco. Forest Ecology and Management 103: 203-210.

BARCHUK AH, IGLESIAS MR & OVIEDO C. 2006. Rebrote basal de *Aspidosperma quebracho-blanco* en estado de plántula: mecanismo de persistencia en el Chaco Árido. Ecología Austral 16: 197-205.

BARCHUK AH & VALIENTE-BANUET A. 2006. Comparative analysis of leaf angles and sclerophylly of *Aspidosperma quebracho-blanco* in a geographical gradient of water deficit. Austral Ecology 31: 882-891.

BARCHUK AH, VALIENTE-BANUET A & DÍAZ MP. 2005. Effect of shrubs and seasonal variability of rainfall on the establishment of *Aspidosperma quebracho-blanco* in two edaphically contrasting environments. Austral Ecology 30: 695-705.

BARLEBEN L, MA XY, KOEPKE J, PENG G, MICHEL H & STÖCKIGT J. 2005. Expression, purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of strictosidine glucosidase, an enzyme initiating biosynthetic pathways to a unique diversity of indole alcaloide skeletons. Biochimica et Biophysica Acta 1747: 89-92.

BECERRA V & PAREDES M. 2000. Marcadores bioquímicos y moleculares en estudios de diversidad genética. Agricultura Técnica 60: 270-281.

BEEBE SE, OCHOA I, SKROCH PW, NIENHUIS J & TIVANG J. 1995. Genetic diversity among common-band breeding lines developed for Central America. Crop Science 35: 1178-1183.

BESSEGA C, SAIDMAN BO & VILARDI JC. 2000. Isozyme and RAPD studies in *Prosopis glandulosa* and *P. velutina* (Leguminosae, Mimosoideae). Genetics and Molecular Biology 23: 1-5.

BIANI NB, VESPRINI JL & PRADO DE. 2005. Conocimiento sobre el Gran Chaco Argentino en el Siglo XX. En: Arturi MF, Frangi JL & Goya JF (eds). Ecología y Manejo de los Bosques de Argentina. La Plata: EDULP, e-book.

BIEL JH, DRUKKER AE, MITCHELL TF, SPRENGELER EP, NUHER PA, CONWAY AC & HORITA A. 1959. Central stimulants chemistry and structure-activity relationship of alkyl hydrazines. Journal American Chemical Society 81 (11): 2805-2813.

BIELAWSKI JP, NOACK K & PUMO DE. 1995. Reproducible amplification of RAPD markers from vertebrate DNA. Biotechniques 18: 856-860.

BILONI JS. 1990. Árboles Autóctonos Argentinos. Ed. Tipográfica, Editora Argentina. Buenos Aires, Argentina.

BLUA MJ, HANSCOM Z & COLLIER BD. 1988. Glucocapparin variability among four populations of *Isomeris arborea* Nutt. Journal of Chemical Ecology 14: 623-633.

BOLETTA PE. 1988. Clima del Chaco semiárido. Food and Agriculture Organization (eds.). Desmonte y habilitación de tierras en la región chaqueña semiárida. Office for Latin America and the Caribean, Santiago, Chile. pp 7-21.

BOLETTA PE, RAVELO AC & PLANCHUELO AM. 2003. Utilización de información agrometeorológica y satelital para la evaluación de la desertificación en el Chaco Seco, Departamento Moreno, Santiago del Estero. En: Abraham E, Tomasini D &

Maccagno P (eds.). Desertificación. Indicadores y Puntos de Referencia en América Latina y el Caribe. Zeta Editores, Mendoza Argentina. pp 92-93.

BONGIOVANNI G, LUCHINO N, PALACIO L, EYNARD AR, CANTERO JJ & GOLENIOWSKI ME. 2006. *In vitro* antitumoral activity determination of native plant extracts of the central region of Argentina. Molecular Medicinal Chemistry 10: 22-23.

BONINO EE. 2002. Los cambios ambientales producidos en el Chaco Árido de la provincia de Córdoba desde la colonización europea. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina.

BONINO EE. 2006. Changes in carbon pools associated with a land-use gradient in the Dry Chaco, Argentina. Forest Ecology and Management 223: 183-189.

BONINO EE & ARAUJO P. 2005. Structural differences between a primary and secondary forest in the Argentine Dry Chaco and management implications. Forest Ecology and Management 206: 407-412.

BORNEO R, LEON AE, AGUIRRE A, RIBOTTA P & CANTERO JJ. 2009. Antioxidant capacity of medicinal plants from the Province of Cordoba (Argentina) and their in vitro testing in a model food system. Food Chemistry 112 (3): 664-670.

BOURDY G, OPORTO P, GIMENEZ A & DEHARO E. 2004. A search for natural bioactive compounds in Bolivia through a multidisciplinary approach: Part VI. Evaluation of the antimalarial activity of plants used by Isoceño-Guaraní Indians. Journal of Ethnopharmacology 93: 269-277.

BRASSIOLO M, RENOLFI R, GRAFE W & FUMAGALLI E. 1993. Manejo Silvo-pastoril en el Chaco Semiárido. Quebracho 1: 15-28.

BRITOS AH & BARCHUK AH. 2013. Dinámica de la cobertura vegetal y los usos de la tierra a través de modelos de no-equilibrio. Revista de la Asociación Argentina de Ecología de Paisajes 4: 13-38.

BROWN A, MARTINEZ ORTIZ U, ACERBI M & CORCUERA J (eds.). 2005. La Situación Ambiental Argentina 2005, Fundación Vida Silvestre Argentina, Buenos Aires.

BUSSELL JD, WAYCOTT M & CHAPPILL JA. 2005. Arbitrarily amplified DNA markers as characters for phylogenetic Inference. Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics 7: 3-26.

CABIDO MR & ZAK MR. 1999. Vegetación del Norte de Córdoba. Secretaría de Agricultura, Ganadería y Recursos Renovables de Córdoba.

CABRERA AL. 1976. Regiones fitogeográficas argentinas. En: Enciclopedia argentina de Agricultura y Jardinería 2 (1). Acme, Buenos Aires, Argentina. pp 1-85.

CABRERA AL. 1994. Regiones Fitogeográficas Argentinas. En: Enciclopedia Argentina de Agricultura y Jardinería. ACME, Buenos Aires, Argentina.

CABRERA AL & WILLINK A. 1980. Biogeografía de América latina. Monografía OEA. Serie de biología. Nro. 13.

CAETANO-ANOLLES G & BASSAM BJ. 1993. DNA amplification fingerprinting using arbitrary oligonucleotide primers. Applied Biochemistry and Biotechnology 42: 189-200.

CAETANO-ANOLLES G, BASSAM BJ & GRESSHOFF PM. 1991 a. DNA Amplifications Fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide *primers*. Bio/Technology 9: 553-557.

CAHILL JF, KEMBEL SW & GUSTAFSON DJ. 2005. Differential genetic influences on competitive effect and response in *Arabidopsis thaliana*. Journal of Ecology 93: 958-967.

CAMPOS AR, LIMA JR RCP, UCHOA DEA, SILVEIRA ER, SANTOS FA & RAO VSN. 2006. Pro-erectile effects of an alkaloidal rich fraction from *Aspidosperma ulei* root bark in mice. Journal of Ethnopharmacology 104: 240-244.

CARIVEAU D, IRWIN RE, BRODY AK, GARCÍA-MAYEYA LS & VON DER OHE A. 2004. Direct and indirect effects of pollinators and seed predators to selection on plant and floral traits. Oikos 104: 15-26.

CARRIZO E DEL V, PALACIO MO & ROIC LD. 2005. Uso medicinal de algunas especies nativas en Santiago del Estero (República Argentina). Dominguezia 21 (1): 25-32.

CASIVA PV, SAIDMAN BO, VILARDI JC & CIALDELLA AM. 2002. First comparative phenetic studies of Argentinean species of *Acacia* (Fabaceae), using morphometric, isozymal and RAPD approaches. American Journal of Botany 89 (5): 843-853.

CAUJAPÉ-CASTELLS J, MARRERO-RODRÍGUEZ A, BACCARANI-ROSAS M, CABRERA-GARCÍA N & VILCHES-NAVARRETE B. 2008. Population genetics of the endangered Canarian

endemic *Atractylis arbuscula* (Asteraceae): implications for taxonomy and conservation. Plant Systematics and Evolution 274: 99-109.

CHEN XY, FAN XX & HU XS. 2008. Roles of seed and pollen dispersal in natural regeneration of *Castanopsis fargesii* (Fagaceae): Implications for forest management. Forest Ecology and Management 256: 1143-1150.

CHO YH & YOO SD. 2007. ETHYLENE RESPONSE 1 histidine kinase activity of *Arabidopsis* promotes plant growth. Plant Physiology 143: 612-616.

CHOCKALINGAM S, SUNDARI MSN & THENMOZHI S. 1989. Impact of the extract of *Catharanthus roseus* on feeding and enzymatic digestive activities of *Spodoptera litura*. Journal of Environmental Biology 10 (3): 303-307.

CIUFFO LE & OJEDA GE. 1995. Teledetección y SIG como herramienta para el análisis de vegetación considerando variables ambientales. Experiencia piloto en un área protegida de la Provincia de San Luis. Memorias .VII Simposio Latinoamericano de Percepción Remota. Latinoamérica evaluada desde el espacio. Sociedad Latinoamericana de Percepción Remota y Sistemas de información espacial.

CIUFFO LEC, CALVO JA, VIDELA AM. 2010. Guía Instructiva Parque Provincial Bajo de Véliz San Luis, Argentina. 2010. 1ra Ed. San Luis. Proyecto de Fundación Universidad Nacional de San Luis "Desarrollo social y conservación de Biodiversidad en Bajo de Véliz. Subsidio: Fondo para las Américas. Proyecto 50/2006. ISBN 978-987-9362-1.

CORDELL GA. 1999. The Alkaloids. Academic Press: San Diego. pp. 261-376.

COUVET D. 2002. Deleterious effects of restricted gene flow in fragmented populations. Conservation Biology 16: 369-376.

CRUSE-SANDERS JM & HAMRICK JL. 2004. Genetic diversity in harvested and protected populations of wild American ginseng, *Panax quinquefolius* L. (Araliaceae). American Journal of Botany 91: 540-548.

D'AURIA JC. 2006. Acyltransferases in plants: a good time to be BAHD. Current Opinion in Plant Biology 9: 331-340.

DAS M, BHATTACHARYA S & PAL A. 2005. Generation and Characterization of SCARs by Cloning and Sequencing of RAPD Products: A Strategy for Species-specific Marker Development in Bamboo. Annals of Botany 95: 835-841.

DAUBENMIRE RF. 1988. Ecología vegetal: tratado de autoecología de plantas. Editorial Limusa. Mexico. pp. 496.

DE LUCA V. 1993. Indole alkaloid biosynthesis. In: Methods in Plant Biochemistry. Enzymes of Secondary Metabolism 9. Lea P (ed.). Academic Press pp. 345-368.

DE LUCA V & CUTLER AJ. 1987. Subcellular Localization of Enzymes Involved in Indole Alkaloid Biosynthesis in *Catharanthus roseus*. Plant Physiology 85: 1099-1102.

DE LUCA V & LAFLAMME P. 2001. The expanding universe of alkaloid biosynthesis. Current Opinion in Plant Biology 4: 225-233.

DE LUCA V, MARINEAU C & BRISSON N. 1989. Molecular cloning and analysis of cDNA encoding a plant tryptophan decarboxylase: comparison with animal dopa decarboxylases. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 86: 2582-2586.

DE LUCA V & ST PIERRE B. 2000. The cell and developmental biology of alkaloid biosynthesis. Trends in Plant Science 5 (4): 168-173.

DEL CASTILLO E, SARAVIA TOLEDO C, GIL N & ZAPATER MA. 1998. Ecología y manejo del quebracho blanco (*Aspidosperma quebracho-blanco*). Primer Congreso Latinoamericano IUFRO. Chile. pp 15.

DEL VITTO LA, PETENATTI EM, NELLAR MM & PETENATTI ME. 1994. Las áreas naturales protegidas de San Luis, Argentina. Multequina 3: 141-156.

DEL VITTO LA, PETENATTI EM & PETENATTI ME. 1997. Recursos herbolarios de San Luis (República Argentina) Primera parte: Plantas Nativas. Multequina 6: 49-66.

DEMAIO P, KARLIN UO & MEDINA M. 2002. ÁRBOLES Nativos del Centro de Argentina. Ed. L.O.L.A.

DE SALLE R & AMATO G. 2004. The Expansion of Conservation Genetics. Nature Reviews Genetics 5: 702-712.

DESIKAN R, HANCOCK JT, BRIGHT J, HARRISON J & WEIR I. 2005. A role for ETR1 in hydrogen peroxide signalling in stomatal guard cells. Plant Physiology 137: 831-834.

DESIKAN R, LAST K, HARRETT-WILLIAMS R, TAGLIAVIA C & HARTER K. 2006. Ethylene-induced stomatal closure in *Arabidopsis* occurs via AtrbohF-mediated hydrogen peroxide synthesis. The Plant Journal 47: 907-916.

DIMITRI MJ, LEONARDIS RFJ, ROSARIO F, LEONARDIS J & BILONI JS. 1997. El nuevo libro del árbol. 3rd edn. Tomo I. Editorial El Ateneo. pp 190.

DOBROVOLSKI R, DINIZ-FILHO JAF, LOYOLA RD & DE MARCO JÚNIOR P. 2011. Agricultural expansion and the fate of global conservation priorities. Biodiversity Conservation 20: 2445-2459.

DOMINGUES TOREZAN JM, FERNANDES DE SOUZA R, RUAS PM, RUAS CF, HASSMANN CAMARGO E & LAFORGA VANZELA AL. 2005. Genetic Variability of Pre and Post-Fragmentation Cohorts of *Aspidosperma polyneuron* Muell. Arg. (Apocynaceae). Brazilian Archives of Biology and Technology 48 (2): 171-180.

DORTAY H, GRUHN N, PFEIFER A, SCHWERDTNER M, SCHMÜLLING T & HEYL A. 2008. Toward an Interaction Map of the Two-Component Signaling Pathway of *Arabidopsis thaliana*. Journal of Proteome Research 7: 3649-3660.

DOYLE JJ & DOYLE JL. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phitochemistry Bulletin 19: 11-15.

DUBREUIL M, RIBA M & MAYOL M. 2008. Genetic structure and Diversity in *Ramonda myconi* (Gesneriaceae): effects of historical climate change on a preglacial relict species. American Journal of Botany 95 (5): 577-587.

ELLSTRAND NC & ELAM DR. 1993. Population genetic consequences of small population size: Implication for conservation. Annual Review of Ecology and Systematics 24: 217-242.

ELLSWORTH DL, RITTENHOUSE KD & HONEYCUTT RL. 1993. Artifactual variation in randomly amplified polymorphic DNA banding patterns. BioTechniques 14: 214-217.

ENDT DV, KIJNE JW & MEMELINK J. 2002. Transcription factors controlling plant secondary metabolism: what regulates the regulators? Phytochemistry 61:107-114.

ESCUDERO A, IRIONDO JM & TORRES ME. 2003. Spatial analysis of genetic diversity as a tool for plant conservation. Biological Conservation 113: 351-365.

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.

EZCURRA CE. 1999. Apocynaceae. En: Zuloaga FO & Morrone O. Catálogo de las Plantas Vasculares de la República Argentina II. Monogr. Syst. Bot. Missouri Botanical Garden. Vol. 74. Missouri Botanical Garden Press, Saint Louis.

FABBRI M, DELP G, SCHMIDT O & THEOPOLD U. 2000. Animal and plant members of a gene family with similarity to alkaloid-synthesizing enzymes. Biochemical and Biophysical Research Communications 271: 191-196.

FACCHINI PJ. 2001. Alkaloid Biosynthesis in Plants: Biochemistry, Cell Biology, Molecular Regulation, and Metabolic Engineering Applications. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 52: 29-66.

FALCONER DS. 1989. Introducción a la genética cuantitativa. Compañía editorial continental, S.A. Calz. De Tlalpan Núm. 4620, México 22, D.F.

FALCONER DS & MACKAY TFC. 1996. Introduction to quantitative genetics. 4th edn. Longman, New York. pp 464.

FERREIRA M & GRATTAPAGLIA D. 1996. Introduçao ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 2 ed. EMBRAPA-CENARGEN. pp 220.

FERREYRA LI, BESSEGA C, VILARDI JC & SAIDMAN BO. 2004. First report on RAPDs patterns able to differentiate some Argentinean species of section Algarobia (*Prosopis*, Leguminosae). Genetica 121: 33-42.

FILIPOV A. 1994. Medicinal Plants of the Pilagá of Central Chaco. Journal of Ethnopharmacology 44: 181-193.

FRANCO-ZORRILLA JM, MARTIN AC, SOLANO R, RUBIO V, LEYVA A & PAZ-ARES J. 2002. Mutations at CRE1 impair cytokinin-induced repression of phosphate starvation responses in *Arabidopsis.* The Plant Journal 32: 353-360.

FRANKE R, HÖFER R, BRIESEN I, EMSERMANN M, EFREMOVA N, YEPHREMOV A & SCHREIBER L. 2009. The DAISY gene from *Arabidopsis* encodes a fatty acid

elongase condensing enzyme involved in the biosíntesis of aliphatic suberin in roots and the chalaza-micropyle region of seeds. The Plant Journal 57: 80-95.

FRANKHAM R, BALLOU JD & BRISCOE DA. 2002. Introduction to Conservation Genetics. Cambridge University Press. Cambridge, UK.

FRANKHAM R, BALLOU JD & BRISCOE DA. 2009. Introduction to Conservation Genetics. Cambridge University Press. Cambridge, UK.

FUTUYMA DJ. 1986. Evolutionary biology. Sinauer. Sunderland.

GANTET P & MEMELINK J. 2002. Transcription factors: tools to engineer the production of pharmacologically active plant metabolites. Trends in Pharmacological Sciences 23: 563-569.

GAO Z, WEN C, BINDER B, YI-FENG CHEN Y, CHANG J, CHIANG Y, KERRIS R, CHANG C & SCHALLER EG. 2008. Heteromeric interactions among ethylene receptors mediate signaling in *Arabidopsis*. The Journal of Biological Chemistry 283 (35): 23801-23810.

GEERLINGS A, MARTINEZ-LOZANO IBAÑEZ M, MEMELINK J, VAN DER HEIJDEN R & VERPOORTE R. 2000. Molecular Cloning and Analysis of Strictosidine β-D-Glucosidase, an Enzyme in Terpenoid Indole Alkaloid Biosynthesis in *Catharanthus roseus*. The Journal of Biological Chemistry 275: 3051–3056.

GILBERT B. 1966. Um estudo fitoquímico do gênero *Aspidosperma*. Anais da Academia Brasileira de Ciências 38: 315-319.

GILLIES AC, NAVARRO C, LOWE AJ, NEWTON AC, HERNÁNDEZ M, WILSON J & CORNELIUS JP. 1999. Genetic diversity in Mesoamerican populations of mahogany (*Swietenia macrophylla*), assessed using RAPDs. Heredity 83: 722-732.

GINZBURG R & ADÁMOLI J. 2005. Situación ambiental en el Chaco Húmedo. En: Brown A, Martínez Ortiz U, Acerbi M & Concuera J (eds.). La Situación Ambiental Argentina 2005, Fundación Vida Silvestre Argentina. Buenos Aires. pp 103-113.

GOLENIOWSKI ME, BONGIOVANNI GA, PALACIO L, NUÑEZ CO & CANTERO JJ. 2006. Medicinal plants from the "Sierra de Comechingones", Argentina. Journal of Ethnopharmacology 107: 324-341.

GÓNGORA-CASTILLO E, CHILDS KL, FEDEWA G, HAMILTON JP, LISCOMBE DK, MAGALLANES-LUNDBACK M, MANDADI KK, NIMS E, RUNGUPHAN W, VAILLANCOURT B, VARBANOVA-HERDE M, DELLAPENNA D, MCKNIGHT TD, O'CONNOR S & BUELL CR. 2012. Development of transcriptomic resources for interrogating the biosynthesis of monoterpene indole alkaloids in medicinal plant species. PLoS One 7: e52506.

GRAPHPAD PRISM version 5.00 for Windows, GraphPad Software, La Jolla California USA, www.graphpad.com

GUIRIMAND G, COURDAVAULT V, LANOUE A, MAHROUG S, GUIHUR A, BLANC N, GIGLIOLI-GUIVARC'H N, ST-PIERRE B & BURLAT V. 2010. Strictosidine activation in Apocynaceae: towards a "nuclear time bomb"? BMC Plant Biology 10: 182.

HAMRICK JL. 2001. Breeding patterns of a tropical dry forest tree species, *Enterolobium cyclocarpum*, in disturbed and undisturbed habitats. In: Ganeshaiah KN, Uma Shaanker R & Bawa KS (eds.). Tropical ecosystems: structure, diversity and human welfare. Oxford and IBH Publishing Co., New Delhi, India. pp 291-294.

HAMRICK JL. 2004. Response of forest trees to global environmental changes. Forest Ecology and Management 197: 323-335.

HAMRICK JL & GODT MJW. 1996 b. Effects of life history traits on genetic diversity in plant species. Philosophical Transactions of The Royal Society of London B 351: 1291-1298.

HAMRICK JL, GODT MJW & SHERMAN-BROYLES SL. 1992. Factors influencing genetic diversity in woody plant species. New Forests 6: 95-124.

HAMRICK JL & LOVELESS MD. 1989. The genetic structure of tropical tree populations: Associations with reproductive biology. In: Bock JH & Linhart YB (eds.). Plant Evolutionary Ecology. Westview Press, Boulder Colo. pp 131-146.

HAMRICK JL & NASON JD. 1996. Consequences of dispersal in plants. In: Population dynamics in ecological space and time. Chicago, IL: University of Chicago Press. pp 203-236.

HARRIS SA. 1999. RAPDs in systematics - a useful methodology? En: Hollingsworth PM, Bateman RM & Gornall RJ (eds.). Molecular Systematics and Plant Evolution. Taylor & Francis, London, pp 211-228.

HARTL DL & CLARK AG. 1997. Principles of Population Genetics. Sinauer Associates, Inc. Publishers. Massachusetts, USA.

HE Q, VILJANEN MK & MERTSOLA J. 1994. Effects of thermocyclers and primers on the reproducibility of banding patterns in randomly amplified polymorphic DNA analysis. Molecular and Cellular Probes 8: 155-160.

HORÁK J, GREFEN C, BERENDZEN KW, HAHN A, STIERHOF Y, STADELHOFER B, STAHL M, KONCZ C & HARTER K. 2008. The *Arabidopsis thaliana* response regulator ARR22 is a putative AHP phospho-histidine phosphatase expressed in the chalaza of developing seeds. BMC Plant Biology 8:77.

HUANG G, MA S, BAI L, ZHANG L, MA H, JIA P, LIU J, ZHONG M & GUO Z. 2012. Signal transduction during cold, salt, and drought stresses in plants. Molecular Biology Reports 39: 969-987.

HUFF DR, PEAKALL R & SMOUSE PE. 1993. RAPD variation within and among natural populations of outcrossing buffalograss *Buchloe dactyloides* (Nutt.) Engelm. Theoretical and Applied Genetics 86: 927-934.

HÜNICKEN MA, AZCUY CL & PENSA MV. 1981. Sedimentitas paleozoicas. En: Irigoyen M. (ed.) Geología recursos naturales de la provincia de San Luís. 8° Congreso Geológico Argentino, Relatorio 55-77, Buenos Aires.

HÜNICKEN MA & PENSA MV. 1975. Estratigrafía y Tectónica de los depósitos Gondwánicos del Bajo de Veliz, Provincia de San Luis, República Argentina. Revista de la Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Universidad Nacional de Córdoba, Serie Ciencias Geológicas 3: 1-37.

HUTCHISON CE, LI J, ARGUESO C, GONZALEZ M, LEE E, LEWIS MW, MAXWELL BB, PERDUE TD, SCHALLER GE, ALONSO JM, ECKER JR & KIEBER JJ. 2006. The *Arabidopsis* histidine phosphotransfer proteins are redundant positive regulators of cytokinin signaling. Plant Cell 18 (11): 3073-3087.

IRMLER S, SCHRÖDER G, ST-PIERRE B, CROUCH NP, HOTZE M, SCHMIDT J, STRACK D, MATERN U & SCHRÖDER J. 2000. Indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus*: new enzyme activities and identification of cytochrome P450 CYP72A1 as secologanin synthase. The Plant Journal 24: 797-804.

JALEEL CA, MANIVANNAN P, KISHOREKUMAR A, SANKAR B, GOPI R, SOMASUNDARAM R & PANNEERSELVAM R. 2007a. Alterations in osmoregulation, antioxidante enzymes and indole alkaloid levels in *Catharanthus roseus* exposed to water deficit. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 59: 150-157.

JALEEL CA, MANIVANNAN P, SANKAR B, KISHOREKUMAR A, GOPI R, SOMASUNDARAM R & PANNEERSELVAM R. 2007b. Water deficit stress mitigation by calcium chloride in *Catharanthus roseus*: effects on oxidative stress, proline metabolism and indole alkaloid accumulation. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 60: 110-116.

JALEEL CA, MANIVANNAN P, SANKAR B, KISHOREKUMAR A, GOPI R, SOMASUNDARAM R & PANNEERSELVAM R. 2007c. Induction of drought stress tolerante by ketoconazole in *Catharanthus roseus* is mediated by enhanced antioxidant potentials and secondary metabolite accumulation. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 60: 201-206.

JALEEL CA, MANIVANNAN P, LAKSHMANAN GMA, GOMATHINAYAGAM M & PANNEERSELVAM R. 2008a. Alterations in morphological parameters and photosynthetic pigment responses of *Catharanthus roseus* under soil water deficits. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 61: 298-303.

JALEEL CA, SANKAR B, MURALI PV, GOMATHINAYAGAM M, LAKSHMANAN GMA, PANNEERSELVAM R. 2008b. Water deficit stress effects on reactive oxygen metabolism in *Catharanthus roseus*; impacts on ajmalicine accumulation. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 62: 105-111.

JARVIS B. 2000. The role of nature products in evolution. Recent Avances in Phytochemistry: 1-24.

JEON J & KIM J. 2013. *Arabidopsis* response Regulator1 and *Arabidopsis* histidine phosphotransfer Protein2 (AHP2), AHP3, and AHP5 function in cold signaling. Plant Physiology 161: 408-424.

JUAREZ-MUÑOZ J, CARRILLO-CASTAÑEDA G, ARREGUIN R & RUBLUO A. 2002. Inter- and intra-genetic variation of four wild populations of *Prosopis* using rapd-pcr fingerprints. Biodiversity and Conservation 11: 921-930.

KALIA RK, RAI MK, KALIA S, SINGH R & DHAWAN AK. 2011. Microsatellite Markers: An overview of the recent progress. Euphytica 177: 309-334.

KANG S, KANG K, LEE K & BACK K. 2007. Characterization of rice tryptophan decarboxylases and their direct involvement in serotonin biosynthesis in transgenic rice. Planta 227: 263-272.

KARAN R, SINGLA-PAREEK SL & PAREEK A. 2009. Histidine kinase and response regulator genes as they relate to salinity tolerance in rice. Functional & Integrative Genomics 9: 411-417.

KARLIN U, COIRINI R, PIETRARELLI L & PERPIÑAL E. 1992. Caracterización del Chaco Árido y Propuesta de Recuperación del Recurso Forestal. En: Sistemas Agroforestales para Pequeños Productores de Zonas Áridas. FCA-UNC - GTZ. pp 7-12.

KARLIN U & DÍAZ R. 1984. Potencialidad y Manejo de Algarrobos del Árido Subtropical Argentino. SECYT. Programa Nacional de Recursos Renovables. pp 50.

KILMURRAY J & VILLAR L. 1981. El basamento de la Sierra de San Luis y su petrología. En: Yrigoyen M. (ed.). Geología y Recursos Minerales de la Provincia de San Luis. 8° Congreso Geológico Argentino, Relatorio 33-54. San Luis.

KIMURA M & CROW JF. 1964. The number of alleles that can be maintained in a finite population. Genetics 49: 725-738.

KJØLNER S, SASTAD SM, TABERLET P & BROCHMANN C. 2004. Amplified fragment length polymorphism versus random amplified polymorphic DNA markers: clonal diversity in *Saxifraga cernua*. Molecular Ecology 13: 81-86.

KONIGHEIM B, AGUILAR J, BATALLAN G, ALMIRÓN W & CONTIGIANI M. 2009. La flora nativa de Córdoba (Argentina) y su importancia en salud pública. Revista de la Facultad de Ciencias Médicas 66 (1): 35-41.

KRAMER K. 2007. Resilience of European forests: towards a non-equilibrium view for the management of diversity. In: Koskela J, Buck A & Teissier du Cros E (eds.). Climate

change and forest genetic diversity: Implications for sustainable forest management in Europe. Bioversity International, Rome Italy. pp 43-52.

KRUTOVSKY KV & BERGMANN F. 1995. Introgressive Hybridization and Phylogenetic Relationships between Norway, *Picea abies* (L.) Karst., and Siberian, *P. obovata* Ledeb. Spruce Species Studied by Isozyme Loci. Heredity 74: 464-480.

KUMAR D, KUMAR A & PRAKASH O. 2012. Potential antifertility agents from plants: A comprehensive review. Journal of Ethnopharmacology 140: 1-32.

KUTCHAN TM. 1995. Alkaloid biosynthesis: the basis for metabolic engineering of medicinal plants. The Plant Cell 7: 1059-1070.

KUTCHAN TM. 2005. A role for intra- and intercellular translocation in natural product biosynthesis. Current Opinion in Plant Biology 8: 292-300.

KUTCHAN TM, DITTRICH H, BRACHER D & ZENK MH. 1991. Enzymology and molecular biology of alkaloid biosynthesis. Tetrahedron 47: 5945-5954.

LAURENTIN H. 2009. Data analysis for molecular characterization of plant genetic resources. Genetic Resources and Crop Evolution 56: 277-292.

LEVIN DA. 2009. Flowering-time plasticity facilitates niche shifts in adjacent populations. New Phytologist 183: 661-666.

LI JM & JIN ZX. 2006. High genetic differentiation revealed by RAPD analysis of narrowly endemic *Sinocalycanthus chinensis* Cheng et S.Y. Chang, an endangered species of China. Biochemical Systematics and Ecology 34: 725-735.

LIN S & BERNARDELLO G. 1999. Flower structure and reproductive biology in *Aspidosperma quebracho-blanco* (Apocynaceae), a tree pollinated by deceit. International Journal of Plant Sciences 160: 869-878.

LOHRMANN J & HARTER K. 2002. Plant two-component signaling systems and the role of response regulators. Plant Physiology 128: 363-369.

LÓPEZ-MEYER M & NESSLER CL. 1997. Tryptophan decarboxylase is encoded by two autonomously regulated genes in *Camptotheca acuminata* which are differentially expressed during development and stress. The Plant Journal 11:1167-1175.

LOYOLA VARGAS VM, SÁNCHEZ ITURBE P, CANTO CANCHÉ B, GUTIÉRREZ PACHECO LC, GALAZ ÁVALOS RM & MORENO VALENZUELA O. 2004. Biosíntesis de los alcaloides indólicos. Una revisión crítica. Journal of the Mexican Chemical Society 48 (1) 67-94.

LUIJENDIJK TJC, VAN DER MEIJDEN E & VERPOORTE R. 1996. Involvement of strictosidine as a defensive chemical in *Catharanthus roseus*. Journal of Chemical Ecology 22 (8): 1355-1366.

MÄHÖNEN AP, HIGUCHI M, TÖRMÄKANGAS K, MIYAWAKI K, PISCHKE MS, SUSSMAN MR, HELARIUTTA Y & KAKIMOTO T. 2006. Cytokinins regulate a bidirectional phosphorelay network in *Arabidopsis*. Current Biology 16: 1116-1122.

MAL TK & LOVETT-DOUST J. 2005. Phenotypic plasticity in vegetative and reproductive traits in an invasive weed, *Lythrum salicaria* (Lythraceae), in response to soil moisture. American Journal of Botany 92: 819-825.

MANEL S, SCHWARTZ K, LUIKART G & TABERLET P. 2003. Landscape genetics: combining landscape ecology and population genetics. Trends in Ecology and Evolution 18: 189-197.

MANTEL N. 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. Cancer Research 27: 209-220.

MANZUR MJ, MUÑOZ RV, LUCERO AA, JURI AYUB M, ALVAREZ SE & CIUFFO GM. 2006. Production of recombinant enzymes of wide use for research. Electronic Journal of Biotechnology 9 (3): 291-296.

MARTINEZ GJ & BARBOZA GE. 2010. Natural pharmacopoeia used in traditional Toba medicine for the treatment of parasitosis and skin disorders (Central Chaco, Argentina). Journal of Ethnopharmacology 9: 86-100.

MASON MG, MATHEWS DE, ARGYROS DA, MAXWELL BB, KIEBER JJ, ALONSO JM, ECKER JR & SCHALLER GE. 2005. Multiple type-B response regulators mediate cytokinin signal transduction in *Arabidopsis*. Plant Cell 17: 3007-3018.

MCDERMOTT JM & MCDONALD BA. 1993. Gene flow in plant pathosystems. Annual Review of Phytopathology 16: 353-374.

MEIJER AH, VERPOORTE R & HOGE JHC. 1993. Regulation of enzymes and genes involved in terpenoid indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus*. Journal of Plant Research 3: 145-164.

MEISNER J, WEISSENBERG M, PALEVITCH D & AHARONSON N. 1981. Phagodeterrency induced by leaves and leaf extracts of *Catharanthus roseus* in the larva of *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera, Noctuidae). Journal of Economic Entomology 74 (2): 131-135.

MEMELINK J, VERPOORTE R & KIJNE JW. 2001. ORCAnization of jasmonate-responsive gene expression in alkaloid metabolism. Trends in Plant Science 6 (5): 212-219.

MEUNIER JR & GRIMOT PA. 1993. Factors affecting reproducibility of random amplified polymorphic DNA fingerprinting. Research in Microbiology 144: 373-379.

MIRA-RODADO V, SWEERE U, GREFEN C, KUNKEL T, FEJES E, NAGY F, SCHAFER E & HARTER K. 2007. Functional cross-talk between two-component and phytochrome B signal transduction in *Arabidopsis*. Journal of Experimental Botany 58 (10): 2595-2607.

MITCHELSON KR, DRENTH J, DUONG H & CHAPARRO JX. 1999. Direct sequencing in RAPD fragments using 3'-extended oligonucleotide primers and dye terminator cycle-sequencing. Nucleic Acid Research 27 (19): e28.

MIZUNO T. 2005. Two-component phosphorelay signal transduction systems in plants: from hormone responses to circadian rhythms. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry 69: 2263-2276.

MOHAPATRA KP, SEHGAL RN, SHARMA RK & MOHAPATRA T. 2009. Genetic analysis and conservation of endangered medicinal tree species *Taxus wallichiana* in the Himalayan region. New Forest 37:109-121.

MOLNÁR A, TÖKÖLYI J, VÉGVÁRI Z, SRAMKÓ G, SULYOK J & BARTA Z. 2012. Pollination mode predicts phenological response to climate change in terrestrial orchids: a case study from central Europe. Journal of Ecology 100:1141-1152.

MONTENEGRO C, STRADA M, BONO J, GASPARRI NI, MANGHI E, PARMUCHI MG & BROUVER M. 2005. Estimación de la pérdida de superficie de bosque nativo y tasa de deforestación en el norte de la Argentina. Equipo técnico de la UMSEF - Unidad de

Manejo del Sistema de Evaluación Forestal - Dirección Bosques – Secretaría de Ambiente y Desarrollo Sustentable. Argentina.

MOORE BD & FOLEY WJ. 2005. Tree use by koalas in a chemically complex landscape. Nature 435: 488-490.

MORELLO J, PROTOMASTRO J, SANCHOLUZ L & BLANCO C. 1985. Estudio macroecológico de los Llanos de La Rioja. Serie del cincuentenario de la Administración de Parque Nacionales 5: 1-53.

NAHUM S, INBAR M, NE'EMAN G & BEN-SHLOMO R. 2008. Phenotypic plasticity and gene diversity in *Pistacia lentiscus* L. along environmental gradients in Israel. Tree Genetics & Genomes 4: 777-785.

NASON JD, ALDRICH PR & HAMRICK JL. 1997. Dispersal and the dynamics of genetic structure in fragmented tropical tree populations. In: Tropical Forest Remnants: Ecology, Management and Conservation of Fragmented Communities (eds Laurance WF, Bierregaard RO), pp. 304–320. University of Chicago Press, Chicago, Illinois.

NAUMANN M. 2006. Atlas del Gran Chaco Sudamericano. Sociedad Alemana de Cooperación Técnica (GTZ). ErreGé & Asoc. Buenos Aires. 92 pp.

NAUMAN M & MADARIAGA M. 2004. Atlas del Gran Chaco Sudamericano. Sociedad Alemana de Cooperación técnica (GTZ). Buenos Aires. 95pp.

NEI M. 1972. Genetic distance between populations. The American Naturalist 106: 283-292.

NEI M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 70: 3321-3323.

NEI M & LI WH. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 76: 5269-5273.

NEI M, MARUYAMA T & CHAKRABORTY R. 1975. The bottleneck effect and genetic variability in populations. Evolution 29: 1-10.

NESPOLO RF. 2000. Desempeño fisiológico, estacionalidad y plasticidad fenotípica en pequeños mamíferos: microevolución de la capacidad de cambio en rasgos termorregulatorios. Revista Chilena de Historia Natural 73: 553-563.

NOVY RC, KOBAC C, GOFFREDA & VORSA N. 1994. RAPDs identify varietal misclassification and regional divergence in cranberry [*Vaccinium macrocarpon* (Ait) Pursh]. Theoretical and Applied Genetics 88: 1004-1010.

NYBON H. 2004. Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. Molecular Ecology 13: 1143-1155.

NYBON H & BARTISH IV. 2000. Effects of life history traits and sampling strategies on genetic diversity estimates obtained with RAPD markers in plants. Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics 3 (2): 93-114.

OJEDA G. 2005. Estudio geológico-geomorfológico y evaluación de la erosión hídrica en el piedemonte austral de la sierra de San Luis. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Físico, Matemáticas y Naturales. Universidad Nacional de San Luis.

OLIVEIRA VB, FREITAS MSM, MATHIAS L, BRAZ-FILHO R & VIEIRA IJC. 2009 b. Atividade biológica de alcalóides indólicos do gênero *Aspidosperma* (Apocynaceae): uma revisão. Revista Brasileira de Plantas Medicinais 11 (1): 92-99.

ORFILA EN. 1995. Frutos, semillas y plántulas de la flora leñosa argentina. Ediciones Sur. La Plata. Argentina. pp. 155.

OSMAN MEH, ELFEKY SS, EL-SOUD KA & HASAN AM. 2007. Response of *Catharanthus roseus* Shoots to Salinity and Drought in Relation to Vincristine Alkaloid Content. Asian Journal of Plant Sciences 6 (8): 1223-1228.

OUBORG NJ, PERTOLDI C, LOESCHCKE V, BIJLSMA R & HEDRICK PW. 2010. Conservation Genetics in Transition to Conservation Genomics. Trends in Genetics 26: 177-187.

PARK S, KANG K, LEE K, CHOI D, KIM YS & BACK K. 2009. Induction of serotonin biosynthesis is uncoupled from the coordinated induction of tryptophan biosynthesis in pepper fruits (*Capsicum annuum*) upon pathogen infection. Planta 230: 1197-1206.

PEAKALL R & SMOUSE PE. 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. Molecular Ecology Notes 6: 288-295.

PEAKALL R, SMOUSE PE & HUFF DR. 1995. Evolutionary implication of allozyme and RAPD variation in diploid populations of diocious buffalograss *Buchloe dactyloides*. Molecular Ecology 4: 135-147.

PELEGRIN N & BUCHER EH. 2010. Long-term effects of a wildfire on a lizard assemblage in the Arid Chaco forest. Journal of Arid Environments 74: 368-372.

PENNER GA, BUSH A, WISE R, KIM W, DOMIER L, KASHA K, LAROCHE A, SCOLES G, MOLNAR SJ & FEDAK G. 1993. Reproducibility of random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis among laboratories. PCR Methods and Applications 2: 341-345.

PENSIERO J, MUÑOZ J & MARTINEZ V. 2005. Informe técnico: Alternativas de sustentabilidad de bosque nativo del Espinal. Etnobotánica. Proyectos de Investigación Aplicada a los Recursos Forestales Nativos (PIARFON). Proyecto Bosques Nativos y Áreas Protegidas Argentina Banco Mundial - N° 4085-AR. pp 1-45.

PEREIRA MM, JÁCOME RL, ALCÂNTARA AF, ALVES RB & RASLAN DS. 2007. Alcalóides indólicos isolados de espécies do gênero *Aspidosperma* (Apocynaceae). Quimica Nova 30 (4): 970-983.

PERSSON HA, LUNDQUIST K & NYBOM H. 1998. RAPD analysis of genetic variation within and among populations of Turk's-cap lily (*Lilium martagon* L.). Hereditas 128: 213-220.

PIÑERO D, BARAHONA A, EGUIARTE L, ROCHA OLIVARES A & SALAS LIZANA R. 2008. La variabilidad genética de las especies: aspectos conceptuales y sus aplicaciones y perspectivas en México, en Capital natural de México. Vol. I: Conocimiento actual de la biodiversidad. Conabio, México. pp 415-435.

PISCHKE MS, JONES LG, OTSUGA D, FERNANDEZ DE, DREWS GN & SUSSMAN MR. 2002 An *Arabidopsis* histidine kinase is essential for megagametogenesis. . Proceedings of the National Academy of Sciences 99: 15800-15805.

PLAS FS, ELMAYAN T & BLEIN JP. 2002. The plasma membrane oxidase NtrbohD is responsible for AOS production in elicited tobacco cells. The Plant Journal 31 (2): 137-147.

PRADO DE. 1993 a. Contribution to the study of flora and vegetation of the Chaco. What is the Gran Chaco vegetation in South America? I. A review. Candollea 48: 145-172.

RAMÍREZ N. 2005. Plant sexual systems, dichogamy and herkogamy in the Venezuelan Central Plain. Flora 200: 30-48.

RIEFLER M, NOVAK O, STRNAD M & SCHMÜLLING T. 2006. *Arabidopsis* cytokinin receptor mutants reveal functions in shoot growth, leaf senescence, seed size, germination, root development, and cytokinin metabolism. The Plant Cell 18 (1): 40-54.

RIESBERG LH & BURKE JM. 2001. The biological reality of species: gene flow, selection and collective evolution. Taxon 50: 235-255.

ROBERTS MF & WINK M. 1998. Alkaloids: biochemistry, ecology and medicinal applications. New York Plenum Press. pp 486.

ROCHA PJ. 2000. Engineering secondary metabolite production in transgenic *Nicotiana tabacum* and *Hyoscyamus muticus* and isolation of MYB sequences from *Catharanthus roseus*. John Innes Centre. Norwich, University of East Anglia. PhD. thesis. 163p

ROCHA PJ & LEECH MJ. 2002. Regulación transcripcional de genes involucrados en la producción de alcaloides indol-terpenoides en plántulas de *Catharanthus roseus*. Revista colombiana de biotecnología IV (2): 17-26.

RODRIGUEZ ME, CARDOZO A, RUIZ DÍAZ M & PRADO DE. 2005. Los bosques nativos misioneros: estado actual de su conocimiento y perspectivas. En: Arturi MF, Frangi JL & Goya JF (eds.). Ecología y Manejo de los Bosques de Argentina. La Plata: EDULP, e-book.

ROHLF FJ. 1998. NTSYS-pc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. Applied Biostatistics Inc.

RONDINA RVD, BANDONI AL & COUSSIO JD. 2008. Especies medicinales argentinas con potencial actividad analgésica. Dominguezia 24 (1): 47-69.

ROOT RB. 1967. The niche exploitation pattern of the blue-grey gnatcatcher. Ecological Monographs 37: 317-350.

ROSSETTO M, WEAVER PK, DIXON KW. 1995. Use of RAPD analysis in devising conservation strategies for the rare and endangered *Grevillea scapigera* (Proteaceae). Molecular Ecology 4: 321-329.

ROSSI CA, DE LEÓN M, GONZÁLEZ GL & PEREYRA AM. 2007. Presencia de metabolitos secundarios en el follaje de diez leñosas de ramoneo en el bosque xerofítico del Chaco Árido argentino. Tropical and Subtropical Agroecosystems 7: 133-143.

RUSZKOWSKI M, BRZEZINSKI K, JEDRZEJCZAK R, DAUTER M, DAUTER Z, SIKORSKI M & JASKOLSKI M. 2013. *Medicago truncatula* histidine-containing phosphotransfer protein: structural and biochemical insights into the cytokinin transduction pathway in plants. The FEBS Journal 280: 3709-3720.

SAITO Y, SHIRAISHI S, TANIMOTO T, YIN L, WATANABE S & IDE Y. 2002. Genetic diversity of *Populus euphratica* populations in northwestern China determined by RAPD DNA analysis. New Forests 23: 97-103.

SAKAKIBARA H, TAKEI K & HIROSE N. 2006. Interactions between nitrogen and cytokinin in the regulation of metabolism and development. Trends in Plant Science 11: 440-448.

SALISBURY FB & ROSS CW. 2000. Fisiología de las plantas. Thompson Editores. España. 988 pp.

SALOME PA, TO JP, KIEBER JJ & MCCLUNG CR. 2006. *Arabidopsis* response regulators ARR3 and ARR4 play cytokinin-independent roles in the control of circadian period. The Plant Cell 18: 55-69.

SCARPA GF. 2002. Plantas empleadas contra trastornos digestivos en la medicina tradicional criolla del Chaco Noroccidental. Dominguezia 18 (1): 36-50.

SCARPA GF. 2004 a. Medicinal plants used by the Criollos of Northwestern Argentine Chaco. Journal of Ethnopharmacology 91 (1): 115-135.

SCHALLER GE, KIEBER JJ & SHIU SH. 2008. Two-Component Signaling Elements and Histidyl-Aspartyl Phosphorelays. The *Arabidopsis* Book. American Society of Plant Biologists.

SCHEMSKE DW, HUSBAND BC, RUCKELSHAUS MH, GOODWILLIE C, PARKER IM & BISHOP JG. 1994. Evaluating Approaches to the Conservation of Rare and Endangered Plants. Ecology 75: 584-606.

SCHIENE K, DONATH S, BRECHT M, PÜHLER A & NIEHAUS K. 2004. A Rab-related small GTP binding protein is predominantly expressed in root nodules of Medicago sativa. Molecular Genetics & Genomics 272: 57-66.

SCHIERWATER B & ENDER A. 1993. Different thermostable DNA polymerases may amplify different RAPD products. Nucleic Acids Research 21: 4647-4648.

SCHIESTL FP. 2005. On the success of a swindle: pollination by deception in orchids. Naturwissenschaften 92: 255-264.

SCOTT JC, KLEIN BA, DURAN-PINEDO A, HU L & DUNCAN MJ. 2013. A Two-Component System Regulates Hemin Acquisition in *Porphyromonas gingivalis*. PLoS One 8: e73351.

SEIGLER DS. 1998. Plant Secondary Metabolism. Kluwer academic Publishers, Norwel (USA).

SEMAAN MT & DODD RS. 2008. Genetic variability and structure of the remnant natural populations of *Cedrus libani* (Pinaceae) of Lebanon. Trees, Genetics and Genomes 4: 757-766.

SHANNON CE & WEAVER W. 1949. The mathematical theory of communication. Univ. Illinois Press, Urbana.

SHI X & RASHOTTE AM. 2012. Advances in upstream players of cytokinin phosphorelay: receptors and histidine phosphotransfer proteins. Plant Cell Reports 31: 789-799.

SLATKIN M. 1994. Gene flow and population structure. In: Ecological Genetics. Real (ed. LA). Princeton University Press. pp 3-18.

SLAVOV GT, DI FAZIO SP & STRAUSS SH. 2004. Gene flow in forest trees: gene migration patterns and landscape modeling of transgene dispersal in hybrid poplar. In: den Nijs, Bartsch D & Sweet J (eds.). Introgression from Genetically Modified Plants into Wild Relatives 106. UK: CAB Int, Wallingford. pp 89-106.

SORK VL & SMOUSE PE. 2006. Genetic analysis of landscape connectivity in tree populations. Landscape Ecology, 21, 821–836.

SORK VL, NASON J, CAMPBELL DR & FERNANDEZ JF. 1999. Landscape approaches to historical and contemporary gene flow in plants. Trends in Ecology & Evolution 14: 219-224.

SOSA P, BATISTA F, GONZÁLEZ MA & BOUZA N. 2002. La Conservación Genética de las Especies Amenazadas. En: Bañares Á (ed.). Biología de la Conservación de Plantas Amenazadas: Técnicas de diagnóstico del estado de conservación. Organismo Autónomo de Parques Nacionales. España. pp 133-160.

SPERLING H, LORENZ A, KREGE S, ARNDT R & MICHEL MC. 2002. An extract from the bark of *Aspidosperma quebracho-blanco* binds to human penile alpha-adrenoceptors. Journal of Urology 168: 160-163.

STATGRAPHICS CENTURION. 2009. Versión XVI. StatPoint Technologies, Inc. Warrenton, U.S.A.

STEBBINS GL. 1950. Variation and Evolution in Plants. Columbia University Press, New York, NY.

STEPHENSON K & HOCH JA. 2002. Two-component and phosphorelay signal-transduction systems as therapeutic targets. Current Opinion in Pharmacology 2: 507-512.

STEVENS LH, BLOM TJM & VERPOORTE R. 1993 a. Subcellular localization of tryptophan decarboxylase, strictosidine synthase, and strictosidine glucosidase in suspension cultured cells of *Catharanthus roseus* and *Tabernaemontana divaricata*. Plant Cell Reports 12: 573-576.

STEVENS LH, GIROUD C, PENNINGS EJM & VERPOORTE R. 1993 b. Purification and characterization of strictosidine synthase from a suspension culture of *Cinchona robusta*. Phytochemistry 33: 99-106.

ST-PIERRE B, VAZQUEZ-FLOTA FA & DE LUCA V. 1999. Multicellular compartmentation of *Catharanthus roseus* alkaloid biosynthesis predicts intercellular translocation of a pathway intermediate. The Plant Cell 11: 887-900.

SVETAZ L, ZULJAN F, DERITA M, PETENATTI E, TAMAYO G, CÁCERES A, CECHINEL FILHO V, GIMÉNEZ A, PINZÓN A, ZACCHINO SA & GUPTA M. 2010. Value of the ethnomedical information for the discovery of plants with antifungal properties. A survey among seven Latin American countries. Journal of Ethnopharmacology 127: 137-158.

TAIZ I, LINCOLN L & GEIGER E. 2006. Secondary Metabolites and Plant Defense. Plant Physiology, Fourth Edition.

TÁLAMO A, CARDOZO S & MOHR F. 2012. Producción de semillas de quebracho blanco (*Aspidosperma quebracho-blanco*) en un sector del Chaco semiárido y su relación con el tamaño del fruto. Bosque 33 (1): 87-91.

TEMPLETON AR. 2006. Population Genetics and Microevolutionary Theory. John Wiley & Sons. Hoboken, New Jersey, USA.

THE NATURE CONSERVANCY, FUNDACIÓN VIDA SILVESTRE ARGENTINA, FUNDACIÓN PARA EL DESARROLLO SUSTENTABLE DEL CHACO & WILDLIFE CONSERVATION SOCIETY BOLIVIA. 2005. Evaluación Ecorregional del Gran Chaco Americano/Gran Chaco Americano Ecorregional Assessment, Buenos Aires, Fundación Vida Silvestre Argentina. <http://www.tnc.org.br/chaco/chaco.html.

THOMASHOW MF. 1999. Plant cold acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 50: 571-599.

TO JP, HABERER G, FERREIRA FJ, DERUERE J, MASON MG, SCHALLER GE, ALONSO JM, ECKER JR & KIEBER JJ. 2004. Type-A *Arabidopsis* response regulators are partially redundant negative regulators of cytokinin signaling. The Plant Cell 16 (3): 658-671.

TORRELLA SA & ADÁMOLI J. 2005. Situación ambiental de la Ecorregión del Chaco Seco. En: Brown A, Martínez Ortiz U, Acerbi M & Corcuera J (eds.). La Situación Ambiental Argentina 2005, Fundación Vida Silvestre Argentina. Buenos Aires.

TORTORELLI LA. 1956. Madera y Bosques Argentinos. Buenos Aires. pp 910.

TREWAVAS A. 2000. Chapter 18: Signal Perception and Transduction. In: Biochemistry and Molecular Biology of Plants. Buchanan BB, Gruissen W & Jones RL (eds). American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD. pp 930-987.

TRILLO C, ARIAS TOLEDO B, GALETTO L & COLANTONIO S. 2010. Persistence of the Use of Medicinal Plants in Rural Communities of the Western Arid Chaco [Córdoba, Argentina]. The Open Complementary Medicine Journal 2: 80-89.

VALLADARES F. 2006. ¿Por qué las plantas difieren en su plasticidad fenotípica? Una perspectiva ecofisiológica sobre la canalización. 2° Congreso Ibérico de Ecología. Lisboa.

VALLETTA A, TRAINOTTI L, SANTAMARIA AR & PASQUA G. 2010. Cell-specific expression of tryptophan decarboxylase and 10-hydroxygeraniol oxidoreductase, key genes involved in camptothecin biosíntesis in *Camptotheca acuminata* Decne (Nyssaceae). BMC Plant Biology 10: 69.

VAN DER FITS L & MEMELINK J. 2000. ORCA3, a jasmonate-responsive transcriptional regulator of plant primary and secondary metabolism. Science 289: 295-297.

VAN DER MEIJDEN E. 1996. Plant defense, an evolutionary dilemma: contrasting effects of (specialist and generalist) herbivores and natural enemies. Entomologia Experimentalis et Applicata 80: 307-310.

VARAS FERNANDEZ M. 1885. Medicina: el quebracho blanco: memoria de prueba de don Manuel Antonio Varas Fernandez en su exámen para optar al grado de licenciado en la Facultad de medicina i farmacia, leida el 10 de diciembre de 1885 Anales de la Universidad de Chile. Consultado http://www.anales.uchile.cl/index.php/ANUC/article/viewArticle/20031/21191

VAZQUEZ-FLOTA F, DE CAROLIS E, ALARCO AM & DE LUCA V. 1997. Molecular cloning and characterization of desacetoxyvindoline-4-hydroxylase, a 2-oxoglutarate dependent-dioxygenase involved in the biosynthesis of vindoline in *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. Plant Molecular Biology 34 (6): 935-948.

VEERABAGU M, ELGASS K, KIRCHLER T, HUPPENBERGER P, HARTER K, CHABAN C & MIRA-RODADO V. 2012. The *Arabidopsis* B-type response regulator 18 homomerizes and positively regulates cytokinin responses. The Plant Journal 72: 721-731.

VERPOORTE R, VAN DER HEIJDEN R & MEMELINK J. 1998. Plant biotechnology and the production of alkaloids: prospects of metabolic engineering. In: Cordell GA (ed.) The Alkaloids 50, 453-508. San Diego: Academic Press.

VICKERY B & VICKERY ML. 1981. Secondary plant metabolism. University Park Press, Baltimore.

VIDELA AM. 2012. Zonificación del Parque Provincial "Bajo de Véliz" y directrices para su plan de manejo. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. Programa de Posgrado en Manejo de Vida Silvestre. Universidad Nacional de Córdoba.

WATERMAN PG. 1998. In: Alkaloids. Biochemistry, ecology, and medicinal applications. Roberts MF & Wink M (eds.) Plenum Press: New York. pp 87-107.

WELSH J & MC CLELLAND M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. Nucleic Acid Research 18: 7213-7218.

WENDT T, FERREIRA-CANELA MB, GELLI DE FARIA AP & IGLESIAS-RIOS R. 2001. Reproductive biology and natural hybridization between two endemic species of *Pitcairnia* (Bromeliaceae). American Journal of Botany 88 (10): 1760-1767.

WHITTAKER RH, LEVIN SA & ROOT RB. 1973. Niche, habitat and ecotope. The American Naturalist 107: 321-338.

WILLAN RL. 1991. Guía para la manipulación de semillas forestales. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Estudio Montes FAO 20/2. 502 pp.

WILLIAMS JGK, HANAFEY M, RAFALSKI LA & TINGEY SV. 1993. Genetic analysis using Random Amplified Polymorphic DNA Markers. Methods in Enzimology 218: 704-740.

WILLIAMS JGK, KUBELIK A, LIVAK K, RAFALSKI LA & TINGEY SV. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acid Research 18: 6531-6535.

WOHLBACH DJ, QUIRINO BF & SUSSMAN MR. 2008. Analysis of the *Arabidopsis* Histidine Kinase ATHK1 Reveals a Connection between Vegetative Osmotic Stress Sensing and Seed Maturation. The Plant Cell 20: 1101-1117.

WONG A, FORBES MR & SMITH ML. 2001. Characterization of AFLP markers in damselflies: prevalence of codominant markers and implications for population genetic applications. Genome 44: 677-684.

WRIGHT S. 1931. Evolution in mendelian populations. Genetics 16: 97-159.

YAMAZAKI Y, URANO A, SUDO H, KITAJIMA M, TAKAYAMA H, YAMAZAKI M, AIMI N & SAITO K. 2003. Metabolite profiling of alkaloids and strictosidine synthase activity in camptothecin producing plants. Phytochemistry 62: 461-470.

YANG X & QUIROS C. 1993. Identiffication and classification of celry cultivars with RAPD markers. Theoretical and Applied Genetics 86: 205-212.

YEH FC, YANG RC, BOYLE TBJ, YE ZH & MAO JX. 1997. POPGENE, the user-friendly shareware for population genetic analysis. Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta, Alberta, Canada.

YOKOYAMA A, YAMASHINO T, AMANO Y, TAJIMA Y, IMAMURA A, SAKAKIBARA H & MIZUNO T. 2007. Type-B ARR Transcription Factors, ARR10 and ARR12, are Implicated in Cytokinin-Mediated Regulation of Protoxylem Differentiation in Roots of *Arabidopsis thaliana*. Plant Cell Physiology 48: 84-96.

YOUNG AG, BOYLE T & BROWN T. 1996. The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. Trends in Ecology & Evolution 11: 413-418.

YU K & PAULS KP. 1992. Optimization of the PCR program for RAPD analysis. Nucleic Acids Research 20: 2606.

ZAGHLOUL MS, HAMRICK JL, MOUSTAFA AA, KAMEL WM & EL-GHAREEB R. 2006. Genetic Diversity Within and Among Sinai Populations of Three Ballota Species (Lamiaceae). Journal of Heredity 97 (1): 45-54.

ZARRILLI AG. 2007. Bosques vs. agricultura: Una mirada a los límites históricos de la sustentabilidad de los bosques argentinos en un contexto de la explotación capitalista (1900-1950). En: Girbal-Blacha N & Mendonça S. (coord.). Cuestiones agrarias en Argentina y Brasil. Prometeo libros ed. Buenos Aires.

ZHANG Y, ZHANG X, CHE Z, WANG L, WEI W & LI D. 2012. Genetic diversity assessment of sesame core collection in China by phenotype and molecular markers and extraction of a mini-core Collection. BMC Genetics 13:102.

ZHU JK. 2002. Salt and Drought Stress Signal Transduction in Plants. Annual Review of Plant Biology 53: 247-273.

AMDG