



Facultad de Ciencias  
Universidad de la República



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

TESINA PARA OPTAR POR EL GRADO DE LICENCIADO EN  
CIENCIAS BIOLÓGICAS

*Baccharis trimera* (Less.) DC. y *Baccharis crispera*  
Spreng. especies de carquejas utilizadas con  
fines medicinales, caracterización y análisis  
genéticos de poblaciones en Lavalleja, Uruguay.

**Cecilia Díaz Cúneo**

**Orientadores:**

**Dra. Cristina Mazzella**

**Prof. Agr. de Genética DT**

**Lab. de Genética – Depto.de Biología Vegetal**

**MSc. Jorge Pereira**

**Prof. Adj. de Genética DT**

**Laboratorio de Biotecnología– Depto.de Biología Vegetal**

**Facultad de Agronomía - UDELAR**

Marzo de 2012



***“No podemos anticipar el mundo en que los humanos vivirán dentro de un siglo o dos. Sin embargo, es nuestra responsabilidad mantener las opciones evolutivas abiertas”.***

Otto Frankel, 1974

***“Conservación genética: nuestra responsabilidad evolutiva”.***

## AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo es un esfuerzo en el cual participaron varias personas, leyendo, opinando, corrigiendo, teniéndome paciencia, animando y acompañando en tantos momentos. Sin ellos nada de esto hubiera sido posible...

Agradezco eternamente y muy especialmente a mis tutores la Dra. Cristina Mazzella y al MSc. Jorge Pereira que han brindado siempre su total apoyo para la concreción de este trabajo, aportando además de su conocimiento académico y experiencia su mejor disposición en todo momento. Gracias por la paciencia infinita. Al Dr. Mauricio Bonifacino, cuyos aportes en comentarios y correcciones fueron también muy importantes para la resolución de este trabajo.

A todos mis compañeros de laboratorio, especialmente a Inés, Estela, Paula, Rodolfo, Eliana y Alejandro, quienes hicieron de todo esto algo más que un trabajo académico, brindando siempre su total apoyo.

A Emanuel Machín por las correcciones y aliento en cada momento.

A mis amigos cuya motivación siempre presente fue para mí de vital importancia. Especialmente agradezco su presencia.

Agradezco por sobre todas las cosas a mis padres y mis hermanos.

## RESUMEN

El uso medicinal de plantas ha sido una estrategia antiquísima en muchas civilizaciones. *Baccharis trimera* (Less.) DC. y *Baccharis crispa* Spreng., conocidas vulgarmente como carquejas, forman parte del conocimiento etnofarmacológico en la región, en particular en Uruguay donde estas especies son nativas. La caracterización de las mismas permite no sólo ahondar en el conocimiento científico acerca de estas especies, sino también presentar un marco de referencia para futuras investigaciones a fines de preservar la riqueza de estos recursos fitogenéticos. El objetivo de este trabajo es caracterizar genéticamente un par de poblaciones simpátricas de *Baccharis trimera* y *Baccharis crispa*. Se analizó el número cromosómico siendo  $2n=18$  para ambas, y se realizaron cariotipos donde se midieron las longitudes cromosómicas a fines de clasificarlos morfológicamente. Por otra parte el análisis de variabilidad se basó en el estudio de individuos de una población en Salto de Penitente departamento de Lavalleja mediante el uso de isoenzimas como marcadores moleculares para los sistemas peroxidasa (PRX) y malato deshidrogenasa (MDH) para el cálculo de Heterocigosis observada siendo en promedio 0,624 para *B. trimera* y 0,406 para *B. crispa*, Heterocigosis esperada para el equilibrio Hardy-Weinberg promediada en 0,568 para *B. trimera* y 0,573 para *B. crispa*, y el respectivo análisis estadístico para conocer el estado de equilibrio en cada locus. Por último, la comparación de las poblaciones de *Baccharis trimera* y *Baccharis crispa* localizadas en el departamento de Maldonado en cuanto al grado de estructuración genética de las subpoblaciones estudiadas (parámetros F del modelo Fisher-Wright) permitió concluir que, para cada una de las especies podría tratarse de una gran población ampliamente distribuída en esa región de Uruguay.

## INDICE

I. Introducción .....	6
i. <i>Baccharis trimera</i> (Less.) DC. y <i>Baccharis crispa</i> Spreng. ....	6
ii. Las isoenzimas como marcadores moleculares .....	10
iii. Análisis de la variabilidad genética .....	12
iv. Usos medicinales de la carqueja .....	17
v. Justificación de la propuesta .....	18
II. Objetivos .....	19
i. Objetivos generales .....	19
ii. Objetivos específicos .....	19
III. Materiales y Métodos .....	20
i. Análisis citogenético .....	21
ii. Análisis isoenzimático .....	21
IV. Resultados .....	25
i. Análisis citogenético .....	25
ii. Análisis isoenzimático .....	29
1. Análisis de Peroxidasa (PRX) .....	29
2. Análisis de Malato Deshidrogenasa (MDH) .....	30
3. Análisis de datos .....	31
iii. Índices de diversidad genética .....	35
iv. Estructura de la diversidad genética .....	36
V. Discusión .....	39
i. Análisis citogenético .....	39
ii. Análisis isoenzimático .....	40
VI. Consideraciones finales .....	47
VII. Bibliografía .....	48
VIII. Anexos .....	53

## INTRODUCCIÓN

### ***Baccharis trimera* (Less.) DC. y *Baccharis crispa* Spreng.**

*Baccharis trimera* (Less.) DC. y *Baccharis crispa* Spreng. son vulgarmente conocidas como “carquejas” y reconocidas masivamente debido a su amplia distribución en nuestro territorio y a su utilización en la medicina popular. Pertenecen a la familia Asteraceae, la cual representa aproximadamente el 10% de la flora mundial y se caracteriza por su inflorescencia en forma de capítulo (Heiden, 2005; Jeffrey, 2006).

El género *Baccharis* L. es uno de los más numerosos en la familia y de representación exclusivamente americana. Se extiende desde Canadá hasta Tierra del Fuego, incluyendo a Uruguay como uno de sus principales centros de diversidad (Verdi *et al.*, 2005; Abad & Bermejo, 2007; Heiden *et al.*, 2007). Está representado por casi 500 especies diocas (Abad & Bermejo, 2007) de las cuales un quinto de las mismas son diploides con 18 cromosomas y algunas otras poliploides (Hunziker *et al.*, 2002). Se trata de plantas que pueden variar desde arbustos enanos a pequeños árboles. Taxonómicamente, debido a la enorme diversidad contenida en el género, a lo largo de la historia se han propuesto varias clasificaciones infragenéricas, producto de las cuales el mismo ha sido dividido en varias secciones.

Las “carquejas” se encuentran dentro de la sección *Baccharis* sect. *Caulopterae* DC., la cual también ha presentado controversias en su clasificación y nomenclatura, siendo los problemas principales los límites entre algunas especies, entre las que se incluyen *B. trimera* y *B. crispa* (Cortadi *et al.*, 1999; Giuliano *et al.*, 2001; Lonni, 2005; Rodríguez *et al.*, 2008; Heiden, 2005; Heiden *et al.*, 2009). *Baccharis* sect. *Caulopterae* es endémica de América del Sur (Fig. 1; Heiden, 2005). En Uruguay Vaio *et al.* (2008) consideran siete especies: *Baccharis trimera*, *Baccharis crispa*, *Baccharis articulata* Pers., *Baccharis sagittalis* DC., *B. genistifolia* DC., *Baccharis Phyteumoides* DC. y *Baccharis microcephala* DC. Recientemente (M. Bonifacino, com. pers.) se informó de la presencia de otras tres nuevas citas para el Uruguay pertenecientes a la misma sección: *Baccharis jocheniana* G. Heiden & Macias, *B. Riograndensis* Malag & J. Vidal, y una tercer especie no determinada de ubicación restringida al departamento de Treinta y Tres.



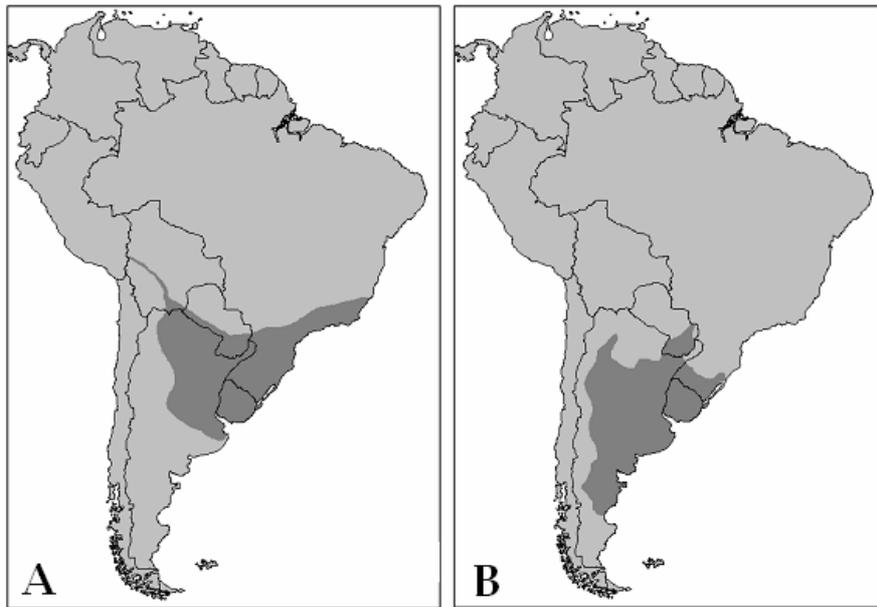
**Figura 1.** Distribución geográfica de las especies de *Baccharis* sect. *Caulopterae* DC. Extraído de Heiden (2005).

*Baccharis crispera* Spreng. y *Baccharis trimera* (Less.) DC. están descritas como subarbustos ramificados desde la base, tallo trialado y capítulos sésiles (Fig. 2). En *Baccharis crispera* las alas de los tallos son onduladas y de ahí su denominación, mientras que en *B. trimera* pueden observarse eventualmente alas con ondulaciones ocasionadas por la presencia de fitopatógenos. Generalmente *B. trimera* alcanza un porte mayor al de *B. crispera* (Cortadi *et al.*, 1999). Ambas especies son perennes y se reproducen en forma sexual por medio de polen cuya dispersión se produce fundamentalmente por viento, y también se reproducen en forma asexual a través de rizomas (Frizon, 2004; Heiden, 2005).



**Figura 2.** A. *Baccharis trimera* (Less.) DC., detalle de ejemplar masculino. B. *Baccharis trimera*, detalle de ejemplar femenino con marcador plástico *in situ* (T 07). C. *Baccharis crispa* Spreng., detalle de ejemplar femenino con marcador plástico *in situ* (C 02). D. *Baccharis crispa*, detalle de ejemplar masculino. (A-D, Salto de Penitente, Lavalleja).

En cuanto a la distribución geográfica (Fig. 3), ambas especies coexisten parcialmente al sur de Río Grande do Sul en Brasil, Uruguay, sur de Paraguay y Mesopotamia Argentina. *Baccharis trimera* (Fig. 3A) se extiende más hacia el Norte y Noreste, y ocupa una mayor diversidad de ambientes incluyendo áreas suburbanas o de pastoreo entre otras (Heiden, 2005). En tanto *Baccharis crispa* (Fig. 3B) se extiende más hacia el Sur y Suroeste del Cono Sur de América, encontrándose preferentemente en terrenos secos y su distribución es más bien discontinua.



**Figura 3.** A. Distribución geográfica de *Baccharis trimera* (Less.) DC. B. Distribución geográfica de *Baccharis crispa* Spreng.

Vaio *et al.*, (2009), determinaron para *Baccharis trimera* y *B. crispa* un complemento cromosómico diploide con 18 cromosomas y contenidos de ADN nuclear con valores 2C de 2,89 pg para *B. trimera* y 3,46 pg para *B. crispa*. Estos números cromosómicos son coincidentes con los previamente descritos para ambas especies en poblaciones de Argentina y Brasil (Cortadi *et al.*, 1999; Frizon, 2004; Heiden, 2005; Rodríguez *et al.*, 2008). El bandeo cromosómico con tinción CMA/DAPI resultó con dos pares de bandas CMA positivas para ambas especies, y la localización de sitios de ADN ribosomales 5S y 45 S fue también igual en ambas especies con un par de sitios para ADNr 45S localizado en forma terminal sobre un par cromosómico satelitado que se corresponde con las bandas CMA positivas terminales y un par de sitios para ADNr 5S en un par cromosómico mediano que se corresponde con las bandas intersticiales CMA positivas. Por otro lado, trabajos recientes utilizando un número de sistemas isoenzimáticos y en poblaciones de Argentina y Brasil han detectado variación para algunos de ellos (Heiden, 2005; Frizon, 2004). En Uruguay Vaco (2011)

analizó la variabilidad genética de estas especies utilizando marcadores moleculares ISSRs y analizó la distancia genética que existe entre estas especies en poblaciones localizadas en 3 regiones de nuestro país. Coincidentemente Carrocio (2011) con el mismo objetivo de analizar la variabilidad genética estudió las mismas especies en poblaciones de una de las localidades estudiadas por Vaco (2011) pero utilizando isoenzimas como marcadores genéticos.

### **Las isoenzimas como marcadores moleculares**

La variabilidad que existe entre los diferentes organismos ha interesado a muchísimos observadores; desde tiempos muy lejanos ha habido seres humanos que se han preguntado acerca de las relaciones existentes entre las diversas formas de vida. Se realizaron entonces varias clasificaciones con diferentes parámetros de separación; en los últimos años con el advenimiento de herramientas genéticas, la separación de los organismos en base a caracteres genéticos ha sido posible y permite estandarizar los procesos de clasificación a todos los seres vivos. Antes de los años sesenta, la mayor parte de las observaciones se realizaban sobre caracteres cuantitativos, lo que presentaba una gran desventaja, ya que la generación de los mismos se debe a la actividad de varios genes, lo cual es a su vez influenciado por el ambiente en que se encuentran (Allendorf & Luikart, 2007). Luego, las técnicas moleculares permitieron acceder íntimamente a la información almacenada en el material genético lográndose observar directamente el comportamiento de genes individuales e independientes (Berg & Hamrick, 1997).

Las isoenzimas representan las diferentes formas de una enzima que integran un organismo, es decir distintas moléculas con actividad enzimática equivalente. Estas diferencias pueden ser detectadas al separar las enzimas en base a su peso molecular y carga, mediante un proceso denominado electroforesis. Así, proteínas que no comparten la misma secuencia aminoacídica migrarán de forma diferencial en una matriz sometida a un campo eléctrico. Posteriormente se revela la posición de estas enzimas que catalizan determinado proceso, mediante tinciones histoquímicas de productos específicos de su expresión (Markert & Möller, 1959; Scandalios, 1969; Zeidler, 2000; Van der Bank *et al.*, 2001). De esta forma se puede observar la aparición de patrones característicos o zimogramas para cada individuo analizado. Dado que es la misma especificidad catalítica lo que agrupa a estas variantes enzimáticas bajo el término isoenzimas, a las variantes observadas se les puede otorgar el rango de alternativas de genes (diferentes loci), de locus (diferentes alelos), así como también variantes postraduccionales. Por estos motivos pueden encontrarse distintas isoenzimas en distintos tejidos o estadios ontogénicos de un mismo individuo (Markert & Möller, 1959; Scandalios, 1969). Para la interpretación de los zimogramas es necesario conocer la estructura que las determinadas isoenzimas presentan, a modo de adjudicar correctamente los

genotipos identificados. Entre las isoenzimas utilizadas en este trabajo, Malato Deshidrogenasa (MDH) se ha descrito dimérica y Peroxidasa (PRX) monomérica. Respecto a su actividad MDH participa en la biosíntesis de ácidos grasos al catalizar la reducción de oxalacetato a malato generando poder reductor en forma de NADPH, siendo así uno de los catalizadores principales que participan en el ciclo de Krebs. En vegetales, estas isoenzimas se presentan en tres localizaciones: citoplasma, mitocondria y cloroplasto. Peroxidasa en cambio es una isoenzima que cataliza una diversidad de reacciones donde se produce la oxidación de diferentes donadores de electrones en presencia de peróxido de hidrógeno. (Manchenko, 2003).

Esta técnica de separación de proteínas sobre una matriz, ha sido considerada una herramienta útil para el análisis de la genética poblacional desde hace varias décadas (Ayala *et al.*, 1972). De hecho el uso de las isoenzimas como marcadores genéticos es de amplia aplicación incluyendo la genética de poblaciones pero también en genética del desarrollo, evolución molecular, enzimología, sistemática, medicina y fitomejoramiento, entre otras. (Manchenko, 2003).

Al recurrirse a la expresión de un fragmento de ADN que codifica para determinada función, estamos frente a variantes fenotípicas basadas en diferencias en la secuencia de nucleótidos del individuo. Como marcadores moleculares fenotípicos, son de gran utilidad en estudios evolutivos en plantas debido a que presentan una serie de características de interés: 1- Herencia genética detectable, generalmente mendeliana simple, 2- Codominancia por lo que los patrones de homocigotos y heterocigotos son discriminados con facilidad, 3- Variabilidad comparable directamente entre poblaciones e incluso entre especies diferentes. 4- Requiere de poca cantidad de muestra. 5- Varios loci se expresan durante el ciclo de vida. 6- Puede ser empleado en muchas especies vegetales sin importar su hábitat, tamaño o longevidad (Hamrick, 1989).

La técnica de separación de isoenzimas por electroforesis, presenta además otras ventajas como la alta reproducibilidad de los patrones y su bajo costo relativo. La estructura secundaria de cada isoenzima es de vital importancia para la correcta adjudicación del genotipo representado, por tanto que sea constante para la misma isoenzima en distintas especies representa una estrategia de comparación interesante. (Allendorf & Luikart, 2007).

### **Análisis de la variabilidad genética**

La variabilidad genética es la base de la evolución biológica, las diferentes alternativas y sus respectivas combinaciones en la naturaleza otorgan a las diferentes fuerzas evolutivas tantos caminos como estrellas en el universo. El

origen último de estas variantes son las mutaciones, es decir los cambios en la secuencia de ADN que en ocasiones pueden producir cambios a nivel en la expresión del mismo y son justamente la fuente de la variabilidad genética.

Los marcadores moleculares permiten observar diferencias en el material genético; en particular las isoenzimas revelan variaciones en forma directa que hacen posible determinar los genotipos de los individuos muestreados. De esta forma analizando su fenotipo es posible definir la frecuencia de cada alelo para cada *locus* en cada uno de ellos así entonces describir el pool génico que presentan las especies y estimar la variabilidad genética que existe en cada una de las poblaciones (Manchenko, 2003).

Los parámetros estadísticos que serán utilizados para estimar la variabilidad genética son: la Heterocigosidad (H), es decir la frecuencia de heterocigotos o lo que es lo mismo la fracción de loci heterocigotas en el genotipo del individuo promedio y por otro lado el Porcentaje de loci polimórficos (P), es decir la fracción de loci con al menos dos alelos obtenido a través de la media aritmética del número total de alelos por número de loci.

El modelo de Hardy-Weinberg (modelo H-W) es un arquetipo de genética poblacional que considera una población de individuos diploides que se reproduce sexualmente bajo determinadas premisas para poder estudiar su comportamiento tales como: panmixia, ausencia de migración, mutación, selección o deriva génica considerando un tamaño poblacional infinito (Hardy, 1908). El modelo H-W revela como se comportarían las frecuencias alélicas de un locus autosómico en una población bajo esta serie de condiciones en lo que sería un estado ideal como modelo estadístico. De acuerdo con el modelo H-W una población donde no se producen cambios en las diferentes frecuencias de los alelos generación tras generación se encuentra en equilibrio de H-W, o lo que es lo mismo, si todas las premisas se cumplen, no se producirán cambios en estas frecuencias de una generación a la siguiente. Este enfoque es útil para discernir entre las causas que pueden generar cambios en la población de estudio puesto que en general dentro de las poblaciones naturales no se cumplen todas las características dispuestas por el modelo; de cualquier forma y pese al incumplimiento de ciertos postulados, las frecuencias tienden a aproximarse a los valores predichos por el equilibrio siendo mínimas las desviaciones presentadas (Lessa, 2004).

Las isoenzimas como marcadores de expresión codominante nos permiten identificar los genotipos homocigotas y heterocigotas directamente, así se obtienen no sólo las frecuencias alélicas para cada locus, sino también las

frecuencias genotípicas, es decir, la frecuencia de cada una de las combinaciones de estos alelos.

El modelo de H-W permite a partir de las frecuencias alélicas observadas, estimar las frecuencias genotípicas esperables si la población se encontrara en equilibrio según la igualdad que sigue, donde  $p$  y  $q$  son las frecuencias de 2 alelos diferentes en un locus particular:

$$(p + q)^2 = p^2 + 2pq + q^2 = 1$$

Es posible generalizar la ecuación anteriormente mencionada, para más de 2 alelos puesto que la sumatoria de todas las frecuencias génicas y genotípicas siempre será 1 y las frecuencias esperadas son la expansión binomial de cada una de ellas (Hartl & Clark, 1997).

Mediante este modelo es posible estimar otros aspectos sobre la variabilidad en una población como la heterocigosis ( $H$ ), la cual se calcula en función de las frecuencias alélicas y por tanto su contraparte la homocigosis ( $1-H$ ). De esta manera podemos considerar la heterocigosis observada ( $H_o$ ), es decir la frecuencia de heterocigotos que observamos para cada *locus* con estos marcadores, y la heterocigosis esperada ( $H_e$ ) para los mismos según el equilibrio de Hardy-Weinberg. La heterocigosis esperada se calcula con la ecuación que desarrolla el modelo donde  $q_i$  es la frecuencia del alelo  $i$  y  $k$  es el número de alelos (Nei, 1973).

$$H_e = 1 - \sum_{i=1}^k q_i^2$$

La heterocigosis puede variar de acuerdo al modelo y las observaciones de una población natural entre valores de 0 y 1 ocurriendo el máximo dentro de una población donde todos los individuos son heterocigotas.

Para decidir si las diferencias obtenidas entre las frecuencias observadas y las esperadas son estadísticamente significativas se utiliza la prueba estadística de Chi cuadrado ( $\chi^2$ ). Este test de bondad de ajuste permite decidir si rechazar o no la hipótesis nula que las poblaciones analizadas están en equilibrio H-W para el locus considerado. Como hipótesis alternativa se estipula que las poblaciones no se encuentran en equilibrio H-W. Se utiliza la fórmula de cálculo de  $\chi^2$ :

$$\chi_{cal}^2 = \sum \frac{(\text{numero observado} - \text{numero esperado})^2}{\text{numero esperado}}$$

En dicha fórmula el número observado refiere a los individuos que se presentan con determinado genotipo respecto a los calculados que se esperarían según el modelo de H-W. El  $\chi^2$  calculado se compara con el de la tabla de Chi cuadrado

para un nivel de significancia de  $(\alpha)=0,05$  lo que quiere decir que el modelo estadístico se ajusta con un 95% de probabilidad y un número de grados de libertad generalmente calculado como el número de genotipos diferentes menos el número de alelos presentes. Si el  $\chi^2_{\text{cal}}$  es mayor que el que aparece en la tabla se rechaza la hipótesis nula y por tanto sugiere que la población no se encuentra en equilibrio H-W, por el contrario si el número calculado es menor al que aparece en la tabla no se rechaza la hipótesis nula lo que indica que las frecuencias no cambian significativamente de una generación a la siguiente y por tanto sugiere que la población está en equilibrio para ese locus según el modelo de H-W, aceptándose la hipótesis alternativa.

En relación al análisis de la estructura poblacional, el modelo de Fisher-Wright (F-W) difiere del modelo H-W en el tamaño poblacional, donde para el modelo F-W éste deja de ser infinito para tener una cantidad determinada de individuos  $N$ , por lo que se basa en el estudio de la variación de los  $2N$  alelos posibles. El hecho de que el número de posibilidades sea finito implica que las frecuencias alélicas cambiarán de una generación a la siguiente en forma estocástica, o lo que es igual, la población evoluciona debido a la deriva genética (Allendorf & Luikart, 2007).

La deriva genética es una fuerza evolutiva cuya dirección es errática puesto que cada generación se conforma desde la anterior por un muestreo con reposición al azar, es decir, los alelos que estarán representados en la próxima generación en estas condiciones serán determinados en forma aleatoria por la deriva genética. Las fluctuaciones en las frecuencias de los alelos no son constantes ni en magnitud ni en signo y este proceso ocurre hasta que se produce ya sea la fijación (frecuencia igual a 1) o la eliminación de los alelos (frecuencia cero). A largo plazo la consecuencia de la deriva genética es la reducción de la variación en consecuencia a la fijación de alguno de los alelos. Es menester destacar que cuanto menor sea el tamaño de la población y cuando contamos con frecuencias alélicas extremas (cerca de 1 o 0) el efecto de la deriva genética es aún más acentuado (Hartl & Clark, 1997). El modelo F-W hace posible entender de que manera la reducción en la variabilidad generada por la deriva genética es también una disminución en la heterocigosis de la población, o lo que es lo mismo un aumento en la endogamia de la población, término estrechamente ligado a la homocigosis, puesto que refiere a la probabilidad de que dos alelos sean idénticos por descendencia.

Así desarrolla el concepto de coeficiente de endogamia ( $F$ ) que es justamente una medida de la probabilidad de que los alelos sean idénticos por descendencia, siendo igual a 1 cuando todos los alelos comparten un mismo ancestro común y 0 cuando no comparten ninguno. El modelo de Fisher-Wright permite además calcular la proporción en que se reducen los genotipos

heterocigotas en función del aumento en la proporción de los respectivos homocigotas. Los parámetros estadísticos F de Wright (1921) son útiles en la descripción de esta variabilidad genética, es decir para estudiar la estructura que una población según como se distribuyen geográficamente las variantes o combinaciones alélicas (Wright, 1965).

Las poblaciones presentan una estructuración jerárquica con niveles inclusivos (individuos, subpoblaciones, poblaciones, especie), existe una relación estrecha entre la estructura de los apareamientos y el “ritmo” de la deriva genética, es decir como afecta esta serie de apareamientos no al azar a las desviaciones del equilibrio H-W y la divergencia de las subpoblaciones (Allendorf & Luikart, 2007). El coeficiente de endogamia está basado en la idea de que el efecto de la distribución geográfica diferencial sería comparable al efecto por endogamia dentro de las poblaciones. Así es posible medir este efecto en función de la heterocigosis según se haya constatado un exceso o un déficit en los heterocigotas observados respecto a los homocigotos esperados en el equilibrio de H-W (Hartl & Clark, 1997).

De esta forma se desarrolla el índice F de Wright que estima la proporción en que se reducen los heterocigotas a expensas de los homocigotas en una población no panmíctica con las mismas frecuencias alélicas, y se calcula a partir de la siguiente ecuación:

$$F = \frac{H_e - H_o}{H_e}$$

Este coeficiente F, representa la fracción de heterocigotas que se vuelcan a las fracciones homocigotas a causa de la endogamia respecto a una población en equilibrio H-W (Hartl & Clark, 1997).

En las poblaciones naturales los individuos no se encuentran distribuidos homogéneamente por diferentes causas, en términos de los parámetros de Fisher-Wright, se dice que se encuentran estructuradas geográficamente. Esta estructuración afecta su variabilidad genética y por supuesto la forma en que se distribuyen espacialmente. Una población se considera estructurada si: presenta deriva genética en algunas de sus subpoblaciones, si los apareamientos no ocurren al azar y/o si la migración no se distribuye equitativamente en la población.

Para el estudio de esta subdivisión poblacional los parámetros estadísticos F, son sumamente eficientes (Wright, 1965). En el material de estudio objeto de este trabajo, los citados parámetros estadísticos ya han sido utilizados por Carrocio (2011), al caracterizar mediante marcadores isoenzimáticos, dos poblaciones de *Baccharis trimera* y *B. crispa* en el departamento de Maldonado

separados por 31.5 km de distancia de las muestras objeto de este trabajo. De este modo, las muestras de cada especie en cada sitio de colecta serán analizadas como una subpoblación y los promedios de ambas como la población total.

Los parámetros a calcular serán: 1)  $F_{IS}$  - mide la subdivisión intrapoblacional y representa el desvío en la proporción de heterocigosis esperada dentro de la subpoblación, 2)  $F_{ST}$  - mide la subdivisión geográfica y es el desvío en la proporción de heterocigotas esperados en el equilibrio H-W de la población total respecto a la proporción de heterocigotas esperados dentro de las subpoblaciones y 3)  $F_{IT}$  - mide la endogamia total de la población y es el desvío en la proporción de heterocigotas observados dentro de cada subpoblación respecto al esperado para la población total; debido al apareamiento no al azar dentro de las subpoblaciones ( $F_{IS}$ ) y a la divergencia en las frecuencias alélicas entre subpoblaciones ( $F_{ST}$ ) (Allendorf & Luikart, 2007).

$$(1 - F_{IT}) = (1 - F_{ST})(1 - F_{IS})$$

$F_{IS} = \frac{H_s - H_i}{H_s}$	$-1 < F_{IS} < 1$	$F_{IS} = -1$ Exogamia $F_{IS} = 1$ Endogamia
$F_{ST} = \frac{H_T - H_s}{H_T}$	$0 < F_{ST} < 1$	$F_{ST} = 0$ Panmixia $F_{ST} = 1$ Fijación de alelos alternativos
$F_{IT} = \frac{H_T - H_i}{H_T}$	$-1 < F_{IT} < 1$	Combinación de efectos intra e interpoblacionales

En estas fórmulas se consideran para su cálculo:  $H_i$  heterocigosis observada en cada subpoblación,  $H_s$  heterocigosis esperada según el equilibrio de H-W para cada subpoblación y  $H_T$  heterocigosis esperada para el total de la población si todos los individuos se aparearan aleatoriamente (Nei, 1973).

## Usos medicinales de la carqueja

En la región al Sur de América del Sur, las “carquejas” tradicionalmente han sido utilizadas con fines medicinales, uso que se mantiene en el presente. En los últimos años se ha investigado acerca de la estructura y actividad farmacológica de compuestos químicos presentes en el género *Baccharis*, y se ha organizado la información disponible considerando los aspectos químico-farmacológicos así como también los etnofarmacológicos (Abad & Bermejo, 2007). Son consumidas sus partes aéreas en forma de infusión o decocción para tratamientos gastrointestinales, afecciones hepáticas, como diurético, antiinflamatorio (Paul, 2009) y afrodisíaco, así como también antirreumático y antiséptico de uso externo, entre otros (Abad & Bermejo, 2007). Se destaca la presencia de flavonoides y terpenos tanto en *Baccharis trimera* como en *B. crispa*; varios de estos compuestos han demostrado algunas de las propiedades terapéuticas mencionadas (Cortadi *et al.*, 1999; Mangiaterra, 2005; Verdi *et al.*, 2005; Abad & Bermejo, 2007; Lago *et al.*, 2008; Rodríguez *et al.*, 2008). En cuanto al uso terapéutico de las carquejas, la Farmacopea Argentina cita a *B. crispa* (Petenatti *et al.*, 2007) y la Farmacopea brasilera a *B. trimera* (Carreira *et al.*, 2007), en tanto que en Uruguay es reconocido el uso de ambas (Villamil, 2005; INIA 2004).

En Uruguay el principal enfoque de los trabajos de investigación de los últimos años en estas especies refiere principalmente a su utilización como fitoterápicas e impulsar el cultivo de plantas nativas de uso medicinal como *Baccharis trimera* (INIA, 2004; Fundaquim, 2004). Entre otros objetivos, se tiende a la introducción de algunas especies de amplio uso en la población en una cadena de producción controlada que permita cumplir con la demanda interna así como también impulsar la creación de nuevas oportunidades laborales. Por otra parte, se estudian los procesos y rendimientos de las especies en su industrialización primaria, para la producción de aceites esenciales (INIA, 2004; Fundaquim, 2004; Villamil & Bonnacarrère, 2005).

Con respecto a la venta de plantas medicinales, en Uruguay existe una ordenanza del Ministerio de Salud Pública (MSP) del año 1957 que incluye una lista de especies y algunos lineamientos para su comercialización (Litovsky, 2005). A pesar de esta reglamentación, no se realizan adecuados controles de calidad en cuanto a la identidad botánica de las especies y concentraciones de sustancias de interés, así como tampoco existe contralor de procedencia o forma de colecta de los materiales utilizados. Esta situación favorece la colecta de poblaciones naturales por parte de quienes comercializan estas especies. La extracción extensa y periódica de estas poblaciones, generalmente efectuadas antes del período de floración, ejerce una presión selectiva importante que podría afectar negativamente la variabilidad genética.

## Justificación de la propuesta.

Varias especies nativas de uso como aromáticas y medicinales ven afectadas sus poblaciones naturales por la explotación comercial indiscriminada de la que son objeto. Estas explotaciones son efectuadas sin seguimientos y evaluaciones de tipo ecológico por lo que no se conoce como influye este accionar periódico sobre el estado genético de las poblaciones naturales. La carqueja en particular ha experimentado una demanda creciente en los últimos años, llegando incluso a exportarse desde nuestro país, para ser utilizada por algunas de sus atribuciones terapéuticas. Dentro de las carquejas, las de mayor extracción son *Baccharis trimera* y *Baccharis crispa* para las cuales no existen cultivos comerciales y están expuestas a la colecta sin controles para su posterior introducción al mercado. De esta forma las poblaciones estarían siendo sometidas a una constante presión que podría llegar a afectar su variabilidad genética. Por tanto ahondar en el conocimiento de estas especies nativas y protegerlas de la extracción indiscriminada son estrategias fundamentales para la preservación de estos valiosos recursos fitogenéticos. El estudio de la variabilidad de una especie a nivel de sus poblaciones permite realizar una estimación aproximada del estado de las mismas a fines de decidir acerca de una posible estrategia de conservación de estas especies; además, es importante contar con una amplia base de variabilidad así como también conocer ciertas características de las especies para introducirlas eficazmente en una cadena de producción (cultivo), para asegurar un manejo sustentable (Mast, 1975).

La caracterización genética de *Baccharis trimera* y *B. crispa* ofrece nuevas herramientas para la identificación y conocimiento de las mismas ya sea por medio del estudio de sus cromosomas o de los marcadores alozímicos específicos. La identificación precisa de cada una de las especies, además de ampliar nuestro conocimiento al respecto garantiza la calidad del producto, puesto que la concentración de principios activos de uso terapéutico varía entre las especies.

## 1. OBJETIVOS

### **Objetivo general:**

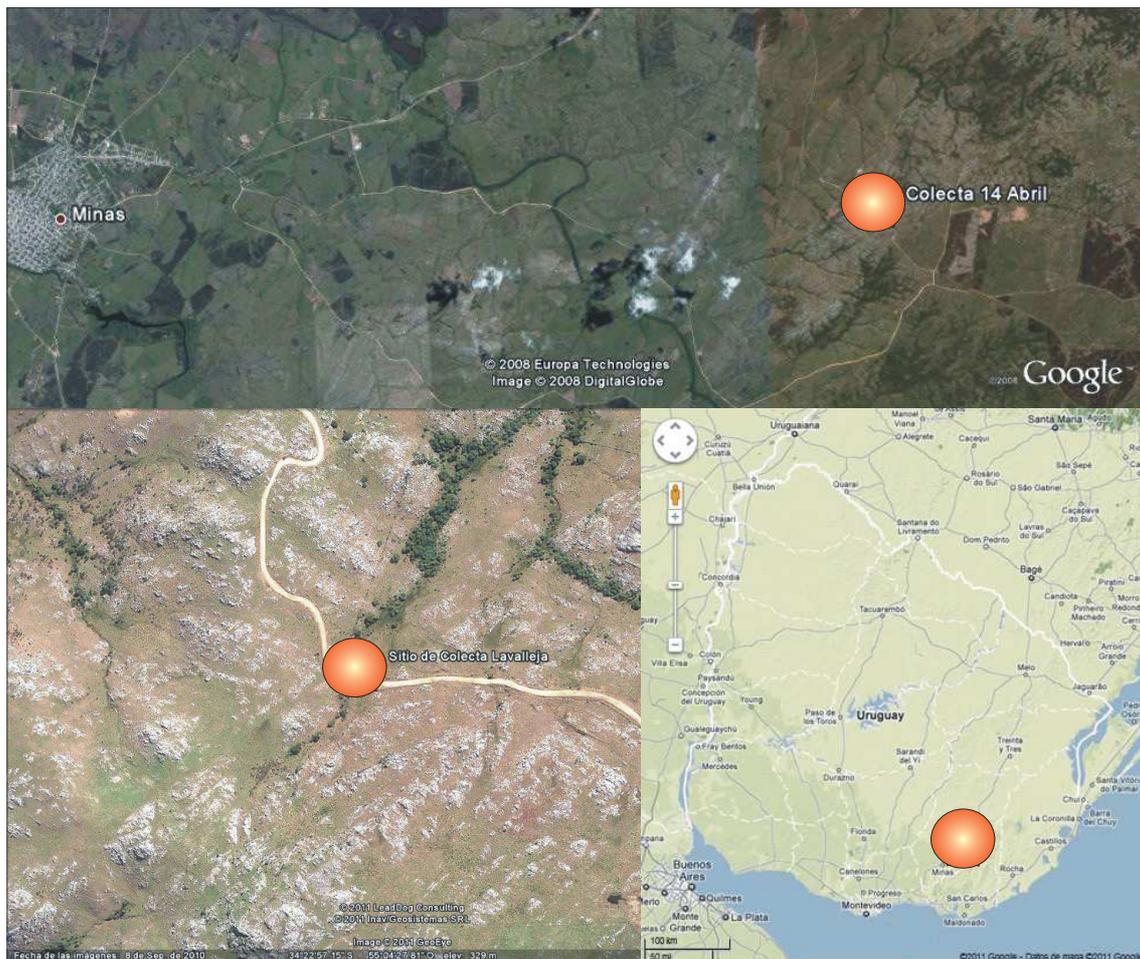
Identificar y caracterizar genéticamente las especies de carqueja *Baccharis trimera* (Less.) DC. y *Baccharis crispa* (Spreng.) y realizar un análisis del grado de variabilidad genética presente dentro de poblaciones seleccionadas, así como también estudiar la posible existencia de flujo génico entre las especies.

### **Objetivos específicos:**

- 1- Análisis de la variabilidad intrapoblacional para *Baccharis trimera* (Less.) DC. y *Baccharis crispa* (Spreng.) utilizando los sistemas isoenzimáticos Peroxidasa (PRX) y Malato deshidrogenasa (MDH) como marcadores moleculares.
- 2- Estudio de la variabilidad genética interpoblacional a fin de estimar la posible ocurrencia de flujo génico entre las dos especies de las poblaciones seleccionadas.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

Las plantas de *Baccharis trimera* (Less.) DC. y *Baccharis crispa* Spreng. fueron seleccionadas de poblaciones naturales simpátricas existentes en la localidad de Salto del Penitente (Lavalleja, Uruguay). La geolocalización de las poblaciones se realizó mediante GPS, situándolas en 34° 22' 13" S y 55° 08' 06" W. (Fig. 4). Los procedimientos experimentales fueron realizados en los Laboratorios de Biotecnología y Genética del Depto. de Biología Vegetal en la Facultad de Agronomía.



**Figura 4.** Sitio de colecta de las poblaciones de *Baccharis trimera* (Less.) DC. y *B. crispa* Spreng., Lavalleja, Uruguay.

El área donde se localizan las poblaciones estudiadas se ubica en una región de serranías con drenaje de aguas por escurrimiento y suelos arcillosos. La temperatura anual promedio es de 17° C y las precipitaciones alcanzan unos 1.250 mm anuales. Se elaboró un esquema geográfico (Anexo I) para mostrar la posición relativa de los individuos en las poblaciones. Allí se muestra que *Baccharis crispa* crece preferentemente en la cercanía de pedregales, incluso

dentro de los mismos, mientras que *B. trimera* crece mayormente en las zonas de transición entre pedregales.

## 2.1. Análisis citogenético

Para analizar la constitución cromosómica que incluye número cromosómico y cariotipo, se seleccionó una muestra de tres plantas de cada una de las poblaciones que serían analizadas por isoenzimas, tanto de *Baccharis trimera* como de *B. crispa*. Estas plantas vivas se mantuvieron en macetas debidamente rotuladas en el invernáculo del Departamento de Biología Vegetal de la Facultad de Agronomía. Los datos de colecta se presentan en Anexo II.

El análisis citogenético se realizó a partir de meristema radicular, para ello se siguió la técnica de Speranza *et al.* (2003) con modificaciones. Se colectan puntas de raíces en horas cercanas al mediodía y se tratan durante 5 horas con 8-hidroxiquinolina (0,002 M). El tiempo de tratamiento para detener la formación del huso mitótico varía en ambas especies: en *Baccharis trimera* se mantienen siempre a temperatura ambiente mientras que *B. crispa* responde mejor con 2,5 horas a temperatura ambiente y 2,5 horas en heladera a 4° C, luego son fijadas con 3 partes de alcohol absoluto y 1 parte de ácido acético glacial y almacenadas en heladera a 4° C al menos por 24 horas. Para la observación de cromosomas, las raíces se someten a un tratamiento con una mezcla de enzimas: Celulasa (Calbiochem®) al 2% y Pectinasa (Sigma®) al 20 % por lo menos 4 horas a 37° C para debilitar las paredes celulares especialmente las que recubren el meristema, y utilizando agujas se extrae la cofia. Se realizan los aplastados en una gota de ácido acético al 45 % y los cubreobjetos se levantan con nitrógeno líquido. Finalmente son teñidos con orceína lactopropiónica al 2 %.

Luego de teñidos los preparados se analizan con un microscopio Olympus® New Vanox donde son seleccionadas las mejores metafases y prometafases. Posteriormente se levantan las imágenes mediante fotografías digitales obtenidas con cámara Olympus® DP 71 y programa DP Manager®. El procesamiento para la confección de los cariotipos se realiza con el programa Adobe PhotoShop®. Las medidas cromosómicas fueron obtenidas con el programa ImageJ® y los pares cromosómicos se clasificaron según la posición del centrómero siguiendo la propuesta de Levan *et al.* (1964). El reconocimiento de cada par se hizo en base a su medida y patrón diferencial de tinción (regiones heteropicnóticas).

## 2.2. Análisis isoenzimático

Para los estudios de variabilidad genética basados en análisis de isoenzimas, se colectan aleatoriamente fragmentos de tallo de 40 individuos adultos en

floración de *Baccharis crispa* y 40 de *B. trimera* siendo 20 de cada sexo respectivamente, ya que se trata de especies dioicas. Cada planta es marcada *in situ* con etiquetas plásticas que permitan ubicar en el terreno las plantas, de este modo se posibilita realizar nuevas colectas de los mismos individuos. Las muestras son conservadas luego de colectadas en hielo (0- 5° C) y posteriormente almacenadas en el laboratorio a -20° C. Esta modalidad de colecta que realiza principalmente la temperatura de las muestras, es un requerimiento necesario para asegurar la estabilidad de las isoenzimas en los tejidos vegetales muestreados. En el Anexo III se presentan los detalles de los individuos estudiados.

Los marcadores empleados fueron los sistemas enzimáticos Peroxidasa (PRX) y Malato deshidrogenasa (MDH). El conocimiento previo de la estructura secundaria de estas enzimas nos permite realizar la interpretación genética de los patrones de bandeo generados. Además fueron probadas las isoenzimas Glutamato-oxaloacetato transaminasa (GOT), 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6-PGDH) y Fosfoglucomotasa (PGM).

La puesta a punto de la técnica en el laboratorio, se realizó en función de variables que afectaban la muestra a analizar tales como cantidad de tejido fresco, concentración del buffer de extracción para cada isoenzima; en cuanto a las variables de la migración electroforética propiamente dicha, se realizaron experimentos con diferentes tipos y concentraciones de buffer tanto para la migración como para la imbibición de la placa de acetato de celulosa utilizada como matriz para la misma; también se ensayaron distintos tiempos de duración de la electroforesis con la finalidad de mejorar la resolución de los patrones de bandas obtenidos para cada sistema isoenzimático en este material vegetal (separación de bandas y zonas de actividad isoenzimática).

Los fragmentos de tallo de cada muestra obtenida para ser analizados electroforéticamente se cortaron en pequeños trozos de 30 µg y posteriormente triturados mecánicamente en tubos eppendorf® de 1,5 ml, con nitrógeno líquido y macerados con una barra de teflón adaptada a la forma del tubo, en presencia de 100µl de buffer de extracción de proteínas (De Souza-Chies, 1992); posteriormente las muestras se centrifugan 1000 RPM durante 1 minuto para separar los restos de material vivo restante, retirándose 7,0 µl de sobrenadante de cada muestra que es sembrado mediante el kit Helena® n° 4090 sobre placas de acetato de celulosa (94 x 76 mm, Helena Laboratories, Beamount, TX; n° ref. 3024) previamente embebidas durante 20 minutos en buffer de corrida diluido según la isoenzima a estudiar.

La migración electroforética se realizó en cuba horizontal (Helena®, mod. 1283) a una intensidad de 200V, lo que aseguró, de acuerdo al buffer elegido y la

concentración correspondiente, mantener la resistencia por debajo de los 10 mA, lo que aseguraba la estabilidad biológica de las muestras. Las condiciones de migración particulares para cada sistema isoenzimático respecto a temperatura, tiempo de corrida y buffer empleado, fueron las consideradas óptimas durante la puesta a punto de la técnica. La solución tampón para la migración fue Tris-Citrato para Peroxidasa y Tampón III (Shaw & Prasad, 1970) para Malato deshidrogenasa. Todos los detalles acerca del tratamiento diferencial para una y otra isoenzima se encuentran en el Anexo IV.

Para la detección en la placa de migración de las zonas de actividad isoenzimática se recurrieron a tinciones histoquímicas específicas para cada isoenzima (Weedel & Weeden, 1989). Como resultado de estas tinciones se observaron en la placa de acetato de celulosa, patrones de bandeo específicos para cada isoenzima y que variaron en la zona que se ubicaron en la matriz, según las muestras analizadas. La tinción de la placa de migración se producía al ponerla en contacto con una solución de agarosa al 1.2% que contiene un conjunto de soluciones para detectar la actividad específica de cada enzima (Anexo IV) durante un tiempo de entre 30 minutos a 1 hora en una estufa a 37° C. Finalmente, luego de la aparición de los diversos patrones de bandas, la coloración de la placa se fija con una solución de Ácido acético al 5% durante 5 minutos; posteriormente se lava con agua destilada y se deja secar para fotografiarla posteriormente sobre un transiluminador con una cámara digital Olympus® DP 71 y programa DP Manager®.

De los patrones de bandas obtenidos mediante el análisis de las diferentes muestras con los dos sistemas isoenzimáticos, se obtuvo un fenotipo multiloci (FML) individual, según la presencia o ausencia de cada una de las bandas detectadas que mostraban diferente movilidad en el campo eléctrico para cada sistema enzimático. Esta información fue el punto de partida para generar una matriz de datos donde cada columna corresponde a una muestra en particular, y las filas la información específica para cada zona de actividad isoenzimática, codificándose los resultados de acuerdo a la presencia o ausencia de banda en cada una de las zonas, donde la presencia de banda se codifica como 1 y la ausencia como 0, y bandas con igual movilidad son consideradas como un mismo alelo del mismo locus.

La caracterización genética de cada muestra hizo posible determinar la estructura genética de cada población, es decir la distribución de la variabilidad en cada especie (Loveless & Hamrick, 1984) para lo que se calcularon las frecuencias alélicas y genotípicas observadas y las esperadas para una población en equilibrio de Hardy-Weinberg. Se realizó el test estadístico de Chi cuadrado para comprobar el grado de coincidencia entre las frecuencias genotípicas observadas y esperadas bajo la hipótesis de equilibrio.

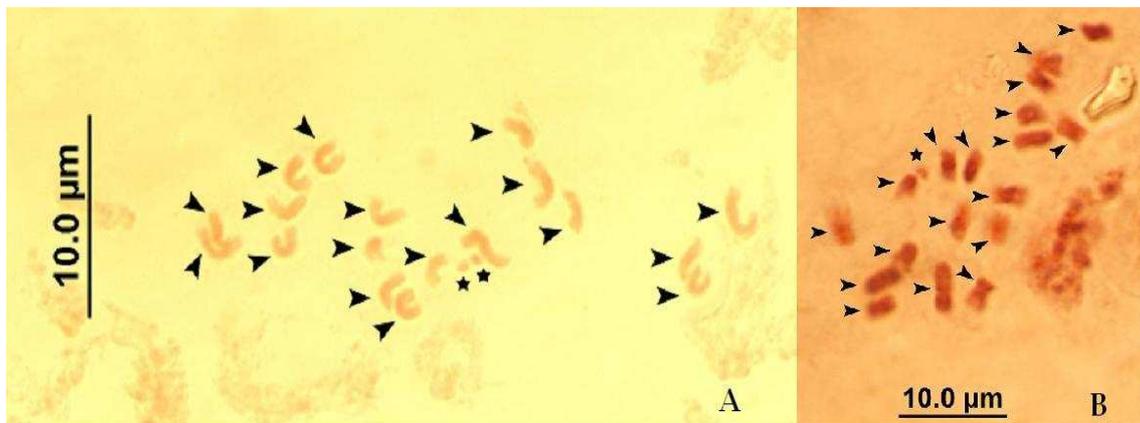
Se calcularon otras medidas de variabilidad a partir de los datos obtenidos como son: heterocigocidad media observada ( $H_o$ ) y esperada en equilibrio H-W ( $H_e$ ), número medio de alelos por locus (A), porcentaje de loci polimórficos (P) y número medio de alelos por locus polimórfico (AP). El índice de fijación de Wright ( $F_{IS}$ ) fue estimado como el desvío respecto a la heterocigocidad esperada (Wright, 1965). Este indicador se calculó para cada locus en cada especie para determinar la relación entre la proporción de individuos homocigotas y heterocigotas.

La distribución de la variabilidad fue comparada con dos sitios de muestreo ubicados en el Km. 29,500 de la ruta 60 en el departamento de Maldonado, a fines de estimar otros parámetros que nos permiten estimar el estado en que se encuentran *B. trimera* y *B. crispa* en el sitio de colecta analizado en este trabajo, respecto a otras poblaciones coespecíficas a 31,5 Km de distancia. Tal comparación se realizó en base a los datos obtenidos por Carrocio (2011). Con esta finalidad se emplearon los parámetros estadísticos F de Wright según la metodología de Nei (1977). Estos estimadores estadísticos están basados en el principio que los desvíos en la heterocigocidad se deben únicamente a los efectos de la deriva genética y el sistema reproductivo. Dichos estimadores calculados fueron  $F_{IS}$ ,  $F_{ST}$  y  $F_{IT}$ . Todos los cálculos fueron realizados para cada una de las especies con el programa Excel de Microsoft Office®.

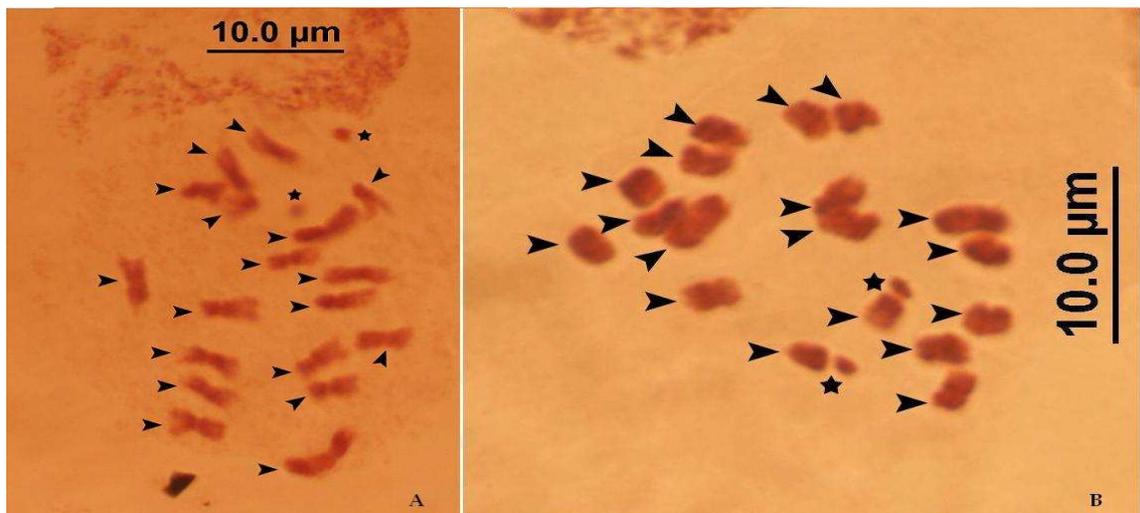
### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Análisis citogenéticos

El conteo cromosómico en los individuos de las poblaciones de *Baccharis trimera* y *B. crispera* analizadas determinó que se trata de especies con 18 cromosomas en sus núcleos somáticos (Figuras 5 y 6). Al microscopio se detectó en ambas un par cromosómico que presenta una región satélite. Por otra parte, el análisis de cariotipos muestra que las dos poblaciones son diploides, con 9 pares de cromosomas.

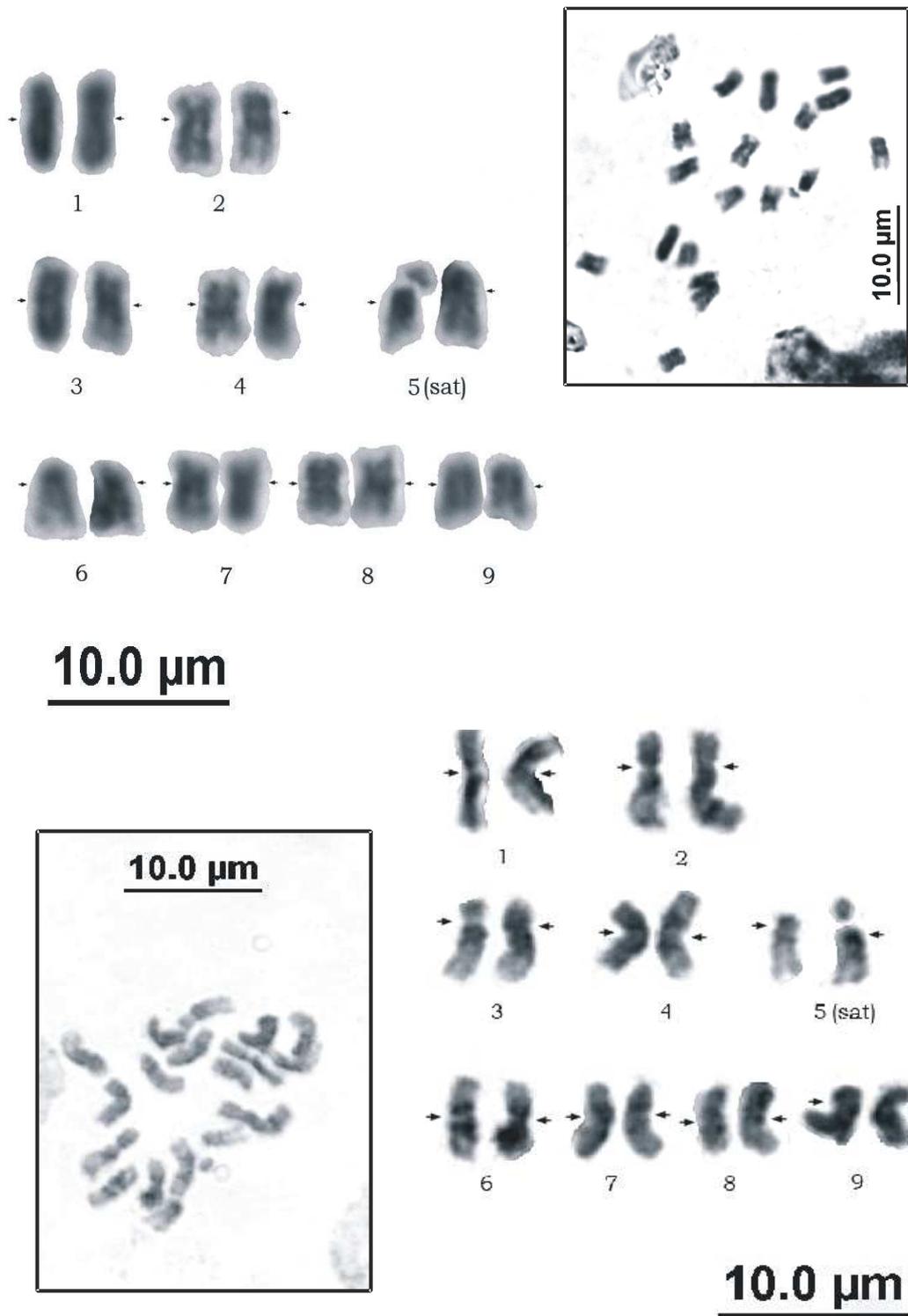


**Figura 5.** Células mitóticas de meristema radicular de *Baccharis trimera* (Less.) DC. en estadios condensados ( $2n=18$ ). **A**, prometafase. **B**, metafase. Las flechas indican cada cromosoma y los asteriscos señalan regiones satélite.

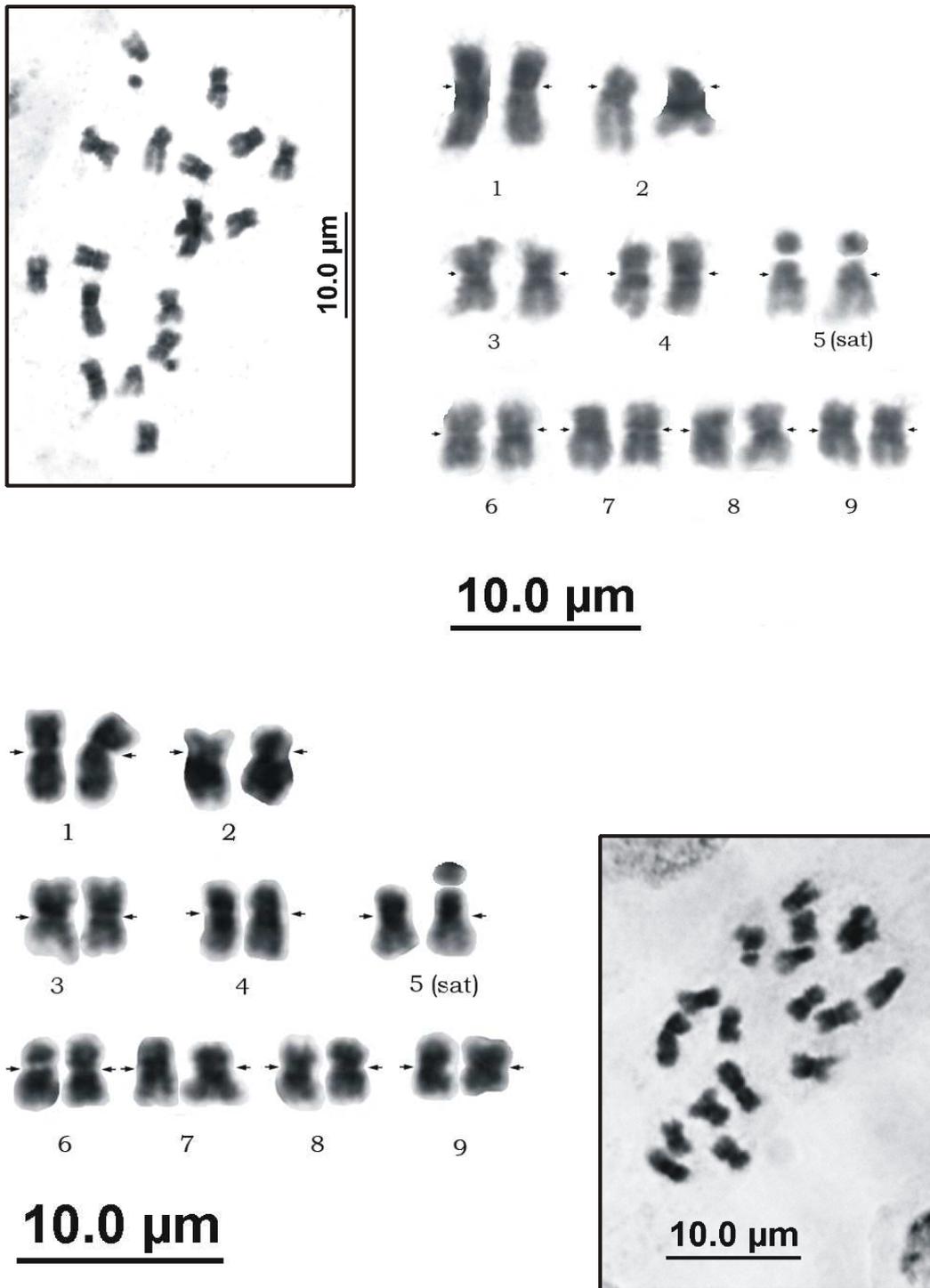


**Figura 6.** Células mitóticas de meristema radicular de *Baccharis crispera* (Spreng.) en estadios condensados ( $2n=18$ ). **A**, prometafase. **B**, Metafase. Las puntas de flecha indican cada cromosoma y los asteriscos señalan regiones satélite.

Los cariotipos de ambas especies son simétricos (disminuyen de tamaño del par 1 al 9) en forma gradual y están compuestos de cuatro pares cromosómicos metacéntricos y cinco submetacéntricos (Fig. 7 y 8).



**Figura 7.** Cariotipos de *Baccharis trimera* (Less.) DC. con 9 pares de cromosomas. Las flechas en cada cromosoma indican región centromérica (analizada al microscopio). **Sat**, indica el par cromosómico con constricción secundaria y satélite. en el recuadro se observa la fotografía de núcleo en metafase de la cual se obtuvo el cariotipo.



**Figura 8.** Cariotipo de *Baccharis crista* Spreng. Obsérvense los 9 pares de cromosomas; el par 5 presenta satélite.

La medición de los largos totales de cada par cromosómico y de cada uno de sus brazos indica que el tamaño total del complemento cromosómico haploide para *Baccharis trimera* es de 34,58 µm, y el de *B. crista* de 31,46 µm. Los tamaños cromosómicos presentaron rangos entre 4,58 µm y 3,09 µm en *B. trimera*, y entre 4,93 µm y 2,75 µm en *B. crista*. En la Tabla 1 se presentan los promedios

de las mediciones realizadas para cada brazo en cada uno de los cromosomas así como su longitud total, para las dos especies.

**Tabla 1.** Promedios de las medidas cromosómicas realizadas en cariotipos de *Baccharis trimera* (A) y *B. crispa* (B). Se indican los valores en  $\mu\text{m}$  para cada brazo p y q de los cromosomas homólogos. En el anexo V de este trabajo se presenta la tabla completa con el detalle de cada una de las medidas.

**A**

Cromosoma	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Total
Brazo p	1,76	1,42	1,6	1,3	1,59	1,28	1,28	1,2	1,18	
Brazo q	2,82	3,21	2,48	2,68	2,38	2,33	2,21	1,98	1,91	
<b>Total</b>	4,58	4,62	4,07	3,99	3,96	3,61	3,49	3,17	3,09	

**B**

Cromosoma	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Total
Brazo p	1,94	1,23	1,61	1,28	1,14	1,12	1,11	1,18	1,18	
Brazo q	2,99	2,93	2,15	2,26	2,06	2,05	1,95	1,72	1,57	
<b>Total</b>	4,93	4,16	3,75	3,54	3,2	3,17	3,07	2,9	2,75	

Por último se calcularon los índices centroméricos según la clasificación de Levan (1964) en base a la longitud del brazo p y la longitud total de los promedios para cada cromosoma dentro de cada especie para clasificar los cromosomas en función de la localización relativa del centrómero.

**Tabla 2.** Cálculo del índice centromérico (IC) en cromosomas de *B. trimera* y *B. crispa*. En verde se presentan los cromosomas identificados como metacéntricos y en color naranja los que entran en la clasificación como submetacéntricos de Levan (1964).

Cromosoma	1	2	3	4	5	6	7	8	9
IC <i>B. trimera</i>	38,43	30,67	39,23	32,69	37,21	35,39	36,7	37,67	38,25
IC <i>B. crispa</i>	39,37	29,61	42,84	36,07	35,68	35,25	36,3	40,76	42,81

Las características de los cariotipos presentados en las Figuras 7 y 8 es similar para las dos especies consideradas por tanto se describe a *B. trimera* y *B. crispa* en forma conjunta. El par 1 es metacéntrico y muestra 3 regiones heteropicnóticas positivas, dos cercanas al centrómero una en cada brazo y la última en la región subteloamérica del brazo largo. El par 2 es submetacéntrico y presenta la región subcentromérica más intensamente teñida. El los pares

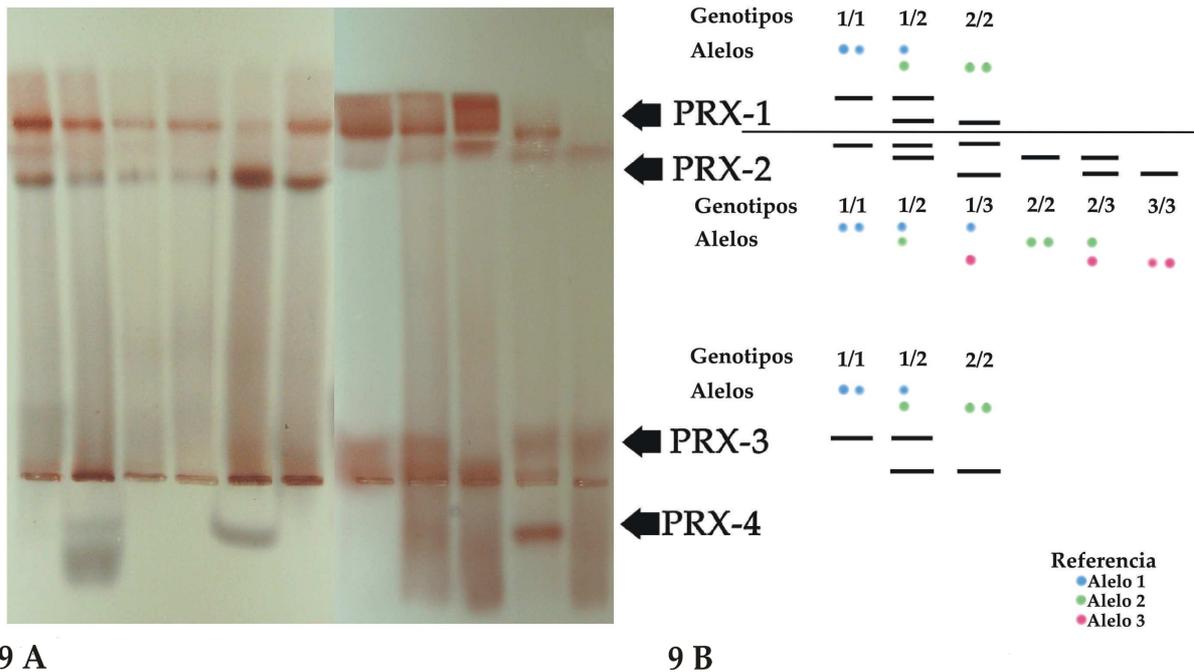
número 3 y 4 presentaron bandas por encima y por debajo del centrómero. El par 5 presenta un satélite en su brazo corto y se tiñe con más intensidad en la región cercana al centrómero. Los pares 6 y 7 exhiben heteroploidosis positiva en la región cercana al centrómero en cada uno de sus brazos. Por último los pares 8 y 9 presentan mayor intensidad de tinción cerca del centrómero en cada brazo y cerca del telómero en el brazo q.

### 3.2. Análisis isoenzimáticos

De los seis sistemas isoenzimáticos analizados, (PRX, MDH, GOT, 6-PGDH y PGM) en poblaciones de *Baccharis trimera* y *Baccharis crispa*, se seleccionaron dos que fueron PRX Y MDH. En el resto no pudieron obtenerse patrones con resolución suficiente como para ser analizados, y se descartaron. Para las dos isoenzimas seleccionadas se detectaron un total de cinco loci. Estos se distribuyen en 3 para Peroxidasa y 2 para Malato Deshidrogenasa en ambas especies, los que fueron elegidos por su mayor reproductibilidad y resolución respecto a otras posibles regiones variables. Para el estudio isoenzimático cada zona de actividad fue interpretada como un locus y las diferentes bandas en la zona de actividad fueron interpretadas como alelos distintos.

#### 3.2.1. Análisis de PEROXIDASA (PRX).

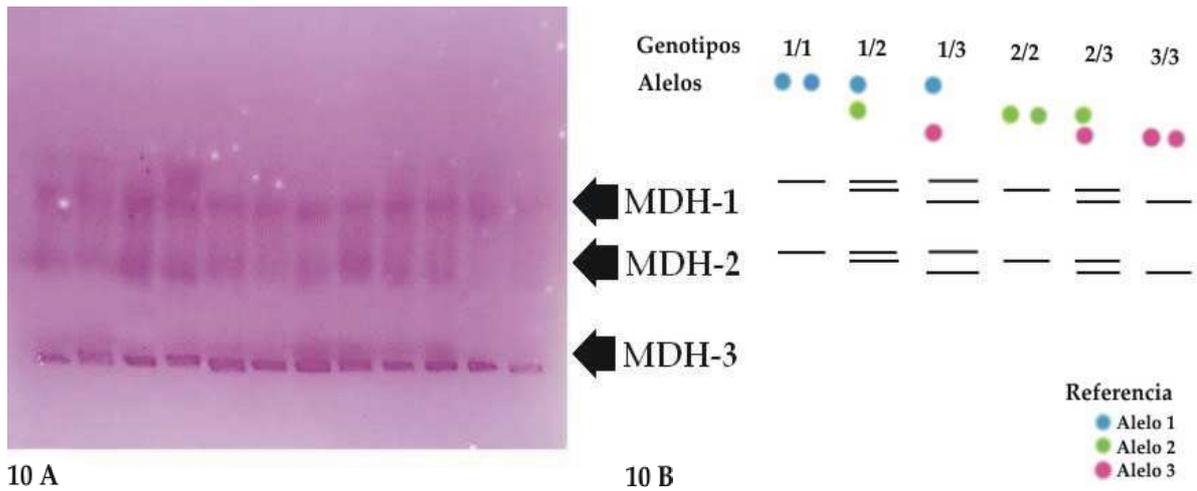
En la Figura 9A, se presenta un esquema de los diferentes perfiles de actividad isoenzimática detectados en Peroxidasa. Se observaron cuatro zonas de actividad de las cuales se estudiaron tres: PRX-1, 2 y 3, por ser las más reproductibles e interpretables visualmente lo que las hace relevantes desde el punto de vista genético. En las zonas PRX -1 y PRX-2 se observaron dos niveles diferentes de migración que aparecen simultáneos en los individuos heterocigotos o de banda única en individuos homocigotos esta interpretación se realiza en base a la estructura monomérica descrita para esta enzima. Cada uno de estas zonas de actividad enzimáticas representa el de mayor y menor migración respectivamente. En tanto que PRX-2 presentó tres niveles de migración, situándose en la zona de actividad intermedia del campo de migración electroforético. Considerándose en total siete alelos para esta enzima. En la figura 9B son representados los diferentes fenotipos posibles en cada zona de actividad o locus.



**Figura 9. A.** Patrones de bandeo observados en las poblaciones de *Baccharis trimera* (Less.) DC. y *Baccharis crispa* Spreng. para el sistema isoenzimático Peroxidasa (PRX). **B.** Esquema de todos los fenotipos posibles.

### 3.2.2. Análisis de MALATO DESHIDROGENASA (MDH)

La isoenzima Malato Deshidrogenasa para la cual se ha descrito una estructura dimérica, presentó tres zonas de actividad de las que dos fueron analizadas por su reproductibilidad e interpretación genética. MDH-1 y 2 ambas con tres niveles de migración. En la figura 10A se presenta un esquema de los diferentes zimogramas detectados, donde se señalan las diferentes zonas de actividad, en la figura 10B se representan los genotipos posibles que fueron asignados a los diferentes loci.



**Figura 10.**

**10 A.** Patrones de bandeo observados en *Baccharis trimera* (Less.) DC. y *Baccharis crispa* Spreng. para el sistema isoenzimático Malato Deshidrogenasa (MDH). **B.** Esquema del total de fenotipos posibles.

### 3. 2. 3. Análisis de datos

En las Tablas 3 y 4 se detallan las frecuencias alélicas y genotípicas observadas para cada sistema en cada población obtenidas desde los propios zimogramas.

**Tabla 3.** Frecuencias alélicas y genotípicas para dos sistemas isoenzimáticos: Peroxidasa (PRX) y Malato deshidrogenasa (MDH) para una población de *Baccharis trimera* (Less.) DC.

<b>PRX-1</b>	Alelo 1	0,458	<b>MDH-1</b>	Alelo 1	0,2875
	Alelo 2	0,542		Alelo 2	0,4625
	Genotipo 1/1	0,139		Alelo 3	0,25
	Genotipo 1/2	0,639		Genotipo 1/1	0,125
Genotipo 2/2	0,222	Genotipo 1/2		0,325	
<b>PRX-2</b>	Alelo 1	0,361		Genotipo 1/3	0
	Alelo 2	0,389		Genotipo 2/2	0,175
	Alelo 3	0,250		Genotipo 2/3	0,25
	Genotipo 1/1	0		Genotipo 3/3	0,125
	Genotipo 1/2	0,472		<b>MDH-2</b>	Alelo 1
	Genotipo 1/3	0,25	Alelo 2		0,4875
	Genotipo 2/2	0,0556	Alelo 3		0,45
	Genotipo 2/3	0,194	Genotipo 1/1		0
Genotipo 3/3	0,0278	Genotipo 1/2	0,125		

<b>PRX-3</b>	Alelo 1	0,436		Genotipo 1/3	0
	Alelo 2	0,564		Genotipo 2/2	0,25
	Genotipo 1/1	0,179		Genotipo 2/3	0,35
	Genotipo 1/2	0,513		Genotipo 3/3	0,275
	Genotipo 2/2	0,308			

**Tabla 4.** Frecuencias alélicas y genotípicas para dos sistemas isoenzimáticos: Peroxidasa (PRX) y Malato deshidrogenasa (MDH) para una población de *Baccharis crispa* Spreng.

<b>PRX-1</b>	Alelo 1	0,577	<b>MDH-1</b>	Alelo 1	0,2125
	Alelo 2	0,423		Alelo 2	0,55
	Genotipo 1/1	0,513		Alelo 3	0,2375
	Genotipo 1/2	0,128		Genotipo 1/1	0,100
	Genotipo 2/2	0,359		Genotipo 1/2	0,225
<b>PRX-2</b>	Alelo 1	0,350	Genotipo 1/3	0	
	Alelo 2	0,450	Genotipo 2/2	0,350	
	Alelo 3	0,200	Genotipo 2/3	0,175	
	Genotipo 1/1	0,150	Genotipo 3/3	0,150	
	Genotipo 1/2	0,300	<b>MDH-2</b>	Alelo 1	0,2375
	Genotipo 1/3	0,100		Alelo 2	0,4375
	Genotipo 2/2	0,250		Alelo 3	0,325
Genotipo 2/3	0,100	Genotipo 1/1		0,0750	
<b>PRX-3</b>	Genotipo 3/3	0,100	Genotipo 1/2	0,300	
	Alelo 1	0,525	Genotipo 1/3	0,0250	
	Alelo 2	0,475	Genotipo 2/2	0,150	
	Genotipo 1/1	0,325	Genotipo 2/3	0,275	
	Genotipo 1/2	0,400	Genotipo 3/3	0,175	
	Genotipo 2/2	0,275			

Las frecuencias alélicas se analizan para conocer si se ajustan al modelo de Hardy-Weinberg mediante el test de bondad de ajuste de Chi cuadrado ( $\chi^2$ ) que permite asumir o no la hipótesis de que las poblaciones en estudio se encuentran en equilibrio.

En las Tablas 5 y 6 se calculan las frecuencias genotípicas esperadas (F.G.E.) si las poblaciones estuvieran en equilibrio de H-W y con ellas se realiza la prueba

estadística a fines de decidir si las mismas son significativamente diferentes a las frecuencias genotípicas observadas (F.G.O.). Los valores calculados de Chi cuadrado ( $\chi^2_{cal}$ ) se estiman en función del número esperado y observado de individuos con el genotipo considerado para cada locus determinado.

**Tabla 5.** Valores observados (F.G.O.) y esperados (F.G.E.) en las frecuencias genotípicas de *Baccharis trimera* (Less.) DC. Valores calculados de Chi cuadrado ( $\chi^2_{cal}$ ) para cada locus analizado en función del número de individuos observados y calculados. (\*) Indica diferencias no significativas con una esperanza mínima de ocurrencia de 5%.

PRX en orden PRX-1, PRX-2 y PRX-3:

F.G.O	F.G.E.	Num. Obs.	Núm. Esp.	Obs - Esp	(O-E) <sup>2</sup>	(O-E) <sup>2</sup> /E
0,139	0,209764	5	7,551504	-2,551504	6,5101727	0,8621028
0,639	0,496472	23	17,872992	5,127008	26,286211	1,4707225
0,222	0,293764	8	10,575504	-2,575504	6,6332209	0,627225
$\chi^2_{cal} =$						2,9600503(*)
0	0,130321	0	4,691556	-4,691556	22,010698	4,691556
0,472	0,280858	17	10,110888	6,889112	47,459864	4,6939363
0,25	0,1805	9	6,498	2,502	6,260004	0,963374
0,0556	0,151321	2	5,447556	-3,447556	11,885642	2,1818302
0,194	0,1945	7	7,002	-0,002	4E-06	5,713E-07
0,0278	0,0625	1	2,25	-1,25	1,5625	0,6944444
$\chi^2_{cal} =$						13,225142
0,179	0,190096	7	7,413744	-0,413744	0,1711841	0,0230901
0,513	0,491808	20	19,180512	0,819488	0,6715606	0,0350127
0,308	0,318096	12	12,405744	-0,405744	0,1646282	0,0132703
$\chi^2_{cal} =$						0,0713731(*)

MDH: en orden MDH-1 y MDH-2:

F.G.O	F.G.E.	Num. Obs.	Núm. Esp.	Obs - Esp	(O-E) <sup>2</sup>	(O-E) <sup>2</sup> /E
0,125	0,0826563	5	3,30625	1,69375	2,8687891	0,8676867
0,325	0,2659375	13	10,6375	2,3625	5,5814063	0,5246915
0	0,14375	0	5,75	-5,75	33,0625	5,75
0,175	0,2139063	7	8,55625	-1,55625	2,4219141	0,2830579
0,25	0,23125	10	9,25	0,75	0,5625	0,0608108
0,125	0,0625	5	2,5	2,5	6,25	2,5
$\chi^2_{cal} =$						9,9862469
0	0,0039063	0	0,15625	-0,15625	0,0244141	0,15625

0,125	0,0609375	5	2,4375	2,5625	6,5664063	2,6939103
0	0,05625	0	2,25	-2,25	5,0625	2,25
0,25	0,2376563	10	9,50625	0,49375	0,2437891	0,0256451
0,35	0,43875	14	17,55	-3,55	12,6025	0,7180912
0,275	0,2025	11	8,1	2,9	8,41	1,0382716
$\chi^2_{\text{cal}} =$						6,8821682

**Tabla 6.** Valores observados (F.G.O.) y esperados (F.G.E.) en las frecuencias genotípicas de *Baccharis crispa* (Spreng.). Valores calculados de Chi cuadrado ( $\chi^2_{\text{cal}}$ ) para cada locus analizado en función del número de individuos observados y calculados. (\*) Indica diferencias no significativas con una esperanza mínima de ocurrencia de 5%.

PRX en orden PRX-1, PRX-2 y PRX-3:

F.G.O	F.G.E.	Num. Obs.	Núm. Esp.	Obs - Esp	(O-E) <sup>2</sup>	(O-E) <sup>2</sup> /E
0,513	0,332929	20	12,984231	7,015769	49,221015	3,7908302
0,128	0,488142	5	19,037538	-14,03754	197,05247	10,350733
0,359	0,178929	14	6,978231	7,021769	49,30524	7,0655786
$\chi^2_{\text{cal}} =$						21,207142
0,15	0,1225	6	4,9	1,1	1,21	0,2469388
0,3	0,315	12	12,6	-0,6	0,36	0,0285714
0,1	0,14	4	5,6	-1,6	2,56	0,4571429
0,25	0,2025	10	8,1	1,9	3,61	0,445679
0,1	0,18	4	7,2	-3,2	10,24	1,4222222
0,1	0,04	4	1,6	2,4	5,76	3,6
$\chi^2_{\text{cal}} =$						6,2005543
0,325	0,275625	13	11,025	1,975	3,900625	0,3537982
0,4	0,49875	16	19,95	-3,95	15,6025	0,7820802
0,275	0,225625	11	9,025	1,975	3,900625	0,4322022
$\chi^2_{\text{cal}} =$						1,5680806(*)

MDH: en orden MDH-1 y MDH-2:

F.G.O	F.G.E.	Num. Obs.	Núm. Esp.	Obs - Esp	(O-E) <sup>2</sup>	(O-E) <sup>2</sup> /E
0,1	0,0451563	4	1,80625	2,19375	4,8125391	2,6643815
0,225	0,23375	9	9,35	-0,35	0,1225	0,0131016
0	0,1009375	0	4,0375	-4,0375	16,301406	4,0375
0,35	0,3025	14	12,1	1,9	3,61	0,2983471

0,175	0,26125	7	10,45	-3,45	11,9025	1,1389952
0,15	0,0564063	6	2,25625	3,74375	14,015664	6,2119287
$\chi^2_{cal} =$						14,364254
0,075	0,0564063	3	2,25625	0,74375	0,5531641	0,2451697
0,3	0,2078125	12	8,3125	3,6875	13,597656	1,6358083
0,025	0,154375	1	6,175	-5,175	26,780625	4,3369433
0,15	0,1914063	6	7,65625	-1,65625	2,7431641	0,3582908
0,275	0,284375	11	11,375	-0,375	0,140625	0,0123626
0,175	0,105625	7	4,225	2,775	7,700625	1,8226331
$\chi^2_{cal} =$						8,4112078

### 3.3 Índices de diversidad genética

Todos los loci analizados resultaron polimórficos de acuerdo al criterio de que los alelos presentes aparezcan con una frecuencia superior a 5% (Hartl & Clark, 1997). También son todos los loci polimórficos de acuerdo al criterio de Berg & Hamrick (1997) según el cual son polimórficos todos los loci que presenten un alelo alternativo sin importar su frecuencia.

La distribución de la variabilidad entre loci, se calculó por medio del número de alelos por locus polimórfico (AP) a partir del número total de alelos en dichos loci sobre el número total de loci analizados. Para *Baccharis trimera* y *Baccharis crispa*, el valor de AP es el mismo (2,6). La tabla con el cálculo se presenta en el Anexo VI. Este valor de AP es igual además a otra medida de variabilidad que es número medio de alelos por locus (A) y esto ocurre puesto que todos los loci considerados han sido polimórficos, por tanto el número medio de alelos por locus es igual al número medio de alelos por locus polimórfico.

A partir de las frecuencias alélicas se estimaron los siguientes índices de diversidad genética: Heterocigosidad observada ( $H_o$ ) calculada como la diferencia numérica entre la suma de las frecuencias de los homocigotos y 1, o lo que es igual, la frecuencia de los heterocigotos; Heterocigosidad esperada ( $H_e$ ) según el equilibrio de Hardy-Weimberg basada en la fórmula de las frecuencias esperadas de heterocigotas y el Índice de fijación de Wright (F) que estudia la proporción relativa de heterocigotas. Estos datos se presentan en la Tabla 7.

**Tabla 7.** Valores de Heterocigosis observada ( $H_o$ ), Heterocigosis esperada por equilibrio H-W ( $H_e$ ) e Índice de fijación (F) para una población de de *Baccharis trimera* (Less.) DC. y *Baccharis crispa* Spreng.

$H_o$	$H_e$		Índice F			
	<i>B. trimera</i>	<i>B. crispa</i>	<i>B. trimera</i>	<i>B. crispa</i>	<i>B. trimera</i>	<i>B. crispa</i>
PRX-1	0,639	0,128	0,496	0,488	-0,288	0,738
PRX-2	0,917	0,5	0,656	0,635	-0,398	0,213
PRX-3	0,513	0,4	0,492	0,499	-0,0427	0,198
MDH-1	0,575	0,4	0,641	0,596	0,103	0,329
MDH-2	0,475	0,6	0,556	0,647	0,146	0,0726
<b>Promedio</b>	<b>0,624</b>	<b>0,406</b>	<b>0,568</b>	<b>0,573</b>	<b>-0,0959</b>	<b>0,338</b>

La heterocigosidad observada promedio fue de 0,624 y 0,406 para *Baccharis trimera* y *B. crispa* respectivamente, en cuanto a la heterocigosidad esperada promedio se obtuvieron valores similares, *B. trimera* con un valor de 0,568 y en *B. crispa* con 0,573. Los índices de fijación alélicas (F) fueron positivos en *B. crispa* con un promedio de 0,338 y contrariamente en *B. trimera* que presentó valores en su mayoría negativos o con valores positivos bajos con un promedio negativo de -0,0959.

### 3.4 Estructura de la diversidad genética

Para el estudio de la estructura geográfica de las poblaciones se calcularon los estadísticos F de Wright, útiles para describir la forma en que las poblaciones se distribuyen geográficamente y como esto afecta su variabilidad. Fueron estimados los coeficientes de endogamia  $F_{IS}$  para el conjunto de muestras de *Baccharis trimera* y *B. crispa* en Salto del Penitente, departamento de Lavalleya y los colectados en el Km 29,500 de la Ruta N° 60 en el Departamento de Maldonado (Carrocio, 2011), y los parámetros  $F_{ST}$  y  $F_{IT}$  de los mencionados sitios de colecta respecto a una población total hipotética que se conformó con las distintas muestras de *B. trimera* y *B. crispa* en estos sitios. En la Figura 11 puede observarse la localización de cada sitio de colecta a las que nombraremos arbitrariamente como subpoblaciones Lavalleya y Maldonado para cada una de las especies.



**Figura 11.** Localización geográfica de las subpoblaciones Llavallaja y Maldonado de *Baccharis trimera* (Less.) DC. y *Baccharis crispa* Spreng.

Tabla 8. Valores calculados de  $F_{IS}$ ,  $F_{ST}$  y  $F_{IT}$  para las subpoblaciones de *Baccharis trimera* (Less.) DC. y *Baccharis crispa* Spreng. en Salto del Peniente, departamento de Llavallaja respecto a subpoblaciones de las mismas especies sobre Ruta 60, departamento de Maldonado.

<i>Baccharis trimera</i> (Less.) DC.			
	$F_{IS}$	$F_{ST}$	$F_{IT}$
<b>PRX-1</b>	-0,130	0,0378	-0,0874
<b>PRX-2</b>	-0,0785	-0,0000761	-0,0785
<b>PRX-3</b>	-0,0475	0,000405	-0,0471
<b>MDH-1</b>	0,272	0,0255	0,291
<b>MDH-2</b>	0,0917	0,0129	0,103
<b>Promedio</b>	<b>0,0215</b>	<b>0,0153</b>	<b>0,0362</b>

<i>Baccharis crispa</i> (Spreng.)			
	$F_{IS}$	$F_{ST}$	$F_{IT}$
<b>PRX-1</b>	0,270	0,0214	0,286

PRX-2	0,131	0,0121	0,0141
PRX-3	0,186	0,00111	0,187
MDH-1	0,335	0,0106	0,342
MDH-2	0,121	0,00437	0,125
<b>Promedio</b>	<b>0,209</b>	<b>0,00992</b>	<b>0,216</b>

Respecto a los valores obtenidos de  $F_{IS}$  se observa que en *Baccharis trimera* los valores son cercanos a cero algunos con signo negativo ocurriendo el más elevado en MDH-1 con 0,272. Esto coincide con lo observado en *Baccharis crispa* para el mismo locus que con un valor de 0,335 ha sido el mayor, por el contrario en los loci restantes todos los valores fueron positivos y no tan cercanos a cero.

Para el coeficiente de fijación  $F_{ST}$  los valores tuvieron un promedio de 0,0141 para *Baccharis trimera* con un único valor negativo observado en PRX-2 y un promedio de 0,00976 para *Baccharis crispa*.

El índice  $F_{IT}$  presentó valores levemente mayores a -0,1 para los loci de Peroxidasa, todos negativos y promedio de 0,2 positivo para Malato deshidrogenasa en *Baccharis trimera*. Por el contrario todos los valores fueron positivos con un promedio de 0,185 para todos los loci analizados en *Baccharis crispa*.

## 4. DISCUSIÓN

### 4.1. Análisis citogenético

El número cromosómico  $2n=18$  concuerda con los obtenidos para *Baccharis trimera* (Frizon, 2004; Vaio *et al.*, 2008) y *Baccharis crispa* (Vaio *et al.*, 2008), así como también para el obtenido en otras especies del mismo género como *Baccharis concinna* G.M. Barroso (Hunziker *et al.*, 2002) y *Baccharis riograndensis* Malag. & J.Vidal (Heiden, 2005). Estudios comparados de número de cromosomas en este género fueron realizados por Heiden (2006) quien considera al género *Baccharis* estable en cuanto al número cromosómico. Además, se considera que  $x=9$  es el número cromosómico básico de la tribu Astereae (Nesom, 2000). En cuanto al análisis de los cariotipos, no se han estudiado para la mayor parte de las especies. En este trabajo se analizaron los patrones de heteropicnosis en los distintos pares cromosómicos, los que corresponden a un bandeo que surge luego de la tinción convencional con el colorante orceína. Las bandas coloreadas diferencialmente representan diferentes grados de condensación de la cromatina y esta tinción es más intensa cuanto mayor dicha condensación. Por ello no sorprende que los mismos patrones de bandeo varíen en los distintos estadios celulares e incluso es interesante la diferenciación que se detecta entre prometafase y metafase mitótica. Guerra (1988) trabajando con otros muchos géneros y especies de plantas concluyó que son los cromosomas prometafásicos los que exponen con mejor claridad las bandas de heteropicnosis llegando incluso a ser tan útiles como el Bando C para identificar cada par cromosómico, no así en metafase.

En relación a los cariotipos en cuanto a número de pares cromosómicos, los datos encontrados en este trabajo son similares entre las dos especies, incluso según Vaio *et al.* (2008) a otras especies de *Baccharis* sect. *Caulopterae* distribuidas en nuestro país (*Baccharis trimera*, *B. crispa*, *B. articulata*, *B. microcephala*, *B. genistifolia* y *B. phyteumoides*), siendo todas diploides. Si bien los cariotipos resultaron en este último trabajo muy similares en sus características generales, las mediciones de contenido de ADN por citometría de flujo permiten distinguirlas. También las descripciones son similares para especies del género presentes en Brasil como *B. riograndensis* (Heiden, 2006), lo que demuestra estabilidad a este nivel, es decir en la estructura y organización de la cromatina.

Por citogenética clásica por medio de tinción con orceína, de los nueve pares cromosómicos se lograron identificar seis por las siguientes características: el par 1 por longitud mayor y aspecto metacéntrico, y el par 2 siguiente en longitud es submetacéntrico. El par cromosómico número 4 fue reconocido por la intensidad de la heteropicnosis positiva por encima y debajo del centrómero en cada brazo. El par 5 por ser portador de una región satélite y por presentar

las cromátidas hermanas separadas en sus extremos, el par 6 submetacéntrico con el centrómero sumamente marcado y el par número 9 por ser el más pequeño en tamaño. Los pares 3, 7 y 8 no fueron distinguibles por la metodología aquí empleada, se sugiere la utilización de técnicas de citogenética molecular, como uso de fluorocromos y tinción diferencial CMA/DAPI y localización de regiones 5S y 45S por FISH.

Los pares cromosómicos fueron clasificados según Levan (1964) resultando de esa forma cuatro cromosomas metacéntricos los pares 1, 3, 8 y 9; y cinco pares submetacéntricos: 2, 4, 5, 6 y 7 en *Baccharis trimera* y en *B. crispa*.

Respecto al par cromosómico número 5 con satélites de cromatina es también mencionado para *B. trimera* y *B. crispa* y otras 5 especies más del género, siendo además portador de sitios de ADN<sub>r</sub> 45S en la región terminal anterior al satélite (Vaio *et al.*, 2008) aunque estos autores lo identifican como el par cromosómico menor. En las mediciones de largo total realizadas, este par ha mostrado ser metacéntrico para *B. trimera* y *B. crispa*. Este punto amerita un estudio de mayor número de individuos y mayor número de poblaciones, para ambas especies. Además debemos remarcar que deberían realizarse en ese caso por lo menos 10 cariotipos de cada especie para poder analizarlos en mayor detalle y de esa forma ordenar la disposición de los cromosomas.

#### **4.2. Análisis isoenzimático**

Los ensayos para la obtención de zimogramas reproducibles y de buena resolución, resultaron en alcanzar una relación óptima en ambas especies, entre la masa de muestra (tallo) y la cantidad de volumen de buffer de extracción de proteínas, siendo de 0,030g de muestra en 150 $\mu$ L de buffer de extracción. Asimismo se optimizó el sistema de buffer para la imbibición de la placa de acetato de celulosa que garantizara una resistencia eléctrica que no superara los 100 mA lo que garantizó la estabilidad proteica de las muestras y separación óptima de las diferentes zonas de migración y las bandas presentes en cada una de ellas. Con una combinación de buffer Tris-Citrato pH = 7 diluido 1/8 para imbibición de la matriz de celulosa y para la cuba de electroforesis se obtuvo la mejor condición de resolución para la isoenzima Peroxidasa, en ambas especies. Las condiciones de migración más eficientes para Malato Deshidrogenasa fueron con el Buffer III (pH = 8) de Shaw-Prasad (1970) diluido 1/4 para la matriz de celulosa y el buffer Tris - Citrato pH=7 en la cuba de electroforesis para las dos especies.

Fueron ensayadas también las isoenzimas Fosfoglucomutasa (PGM), Glutamato Oxalacetato Transaminasa (GOT) y 6 Fosfogluconato Deshidrogenasa (6-

PGDH), pero no se obtuvieron patrones de resolución de bandas lo suficientemente claros como para ser utilizados en nuestro análisis. Las causas que pudieron influir en esta falta de claridad en la resolución de estas isoenzimas pueden haber sido la conservación del material vegetal desde la colecta al análisis de las muestras, que para estas isoenzimas debería haber sido más cuidadosa para la preservación de la estructura secundaria de dichas enzimas que son muy sensibles a la desnaturalización durante el proceso de extracción y puesta en evidencia de la actividad en la placa de migración.

Los diferentes zimogramas obtenidos de los análisis electroforéticos con ambas isoenzimas para las muestras de *Baccharis crispa* y *B. trimera* mostraron la existencia de variabilidad genética dentro de cada especie. Todos los loci analizados resultaron ser polimórficos lo cual estuvo en concordancia con los antecedentes de estudios previos en otras poblaciones de *B. trimera* y *B. crispa* para estos sistemas isoenzimáticos. (Heiden, 2005; Frizon, 2004). En dichos estudios realizados en poblaciones naturales de estas especies en Brasil se obtuvieron con los sistemas isoenzimáticos aplicados en el presente trabajo, alelos poco frecuentes y exclusivos de alguna de las especies, que resultaron en alelos marcadores específicos para *B. trimera* respecto de *B. crispa* y viceversa lo que no ocurrió en nuestro análisis. Tampoco fueron observados alelos completamente fijados en ninguna de las especies al igual que en el trabajo de Carrocio (2011). Esto puede deberse a la relativamente poca cantidad de sistemas isoenzimáticos estudiados respecto a los que abarcaban en otras publicaciones en variabilidad de isoenzimas donde se presentan en general mayor cantidad de genes para su análisis.

Las frecuencias alélicas fueron calculadas para cada uno de los loci analizados y en general no hay diferencias importantes entre las observadas en *Baccharis trimera* y *Baccharis crispa* en cuanto a la correlación de frecuencias. Si comparamos estas frecuencias génicas con las observadas por Carrocio (2011) para los mismos loci, con la excepción del locus MDH-1 los alelos se presentaron en frecuencias similares en relación al orden relativo entre ellos, es decir, para todas las poblaciones los alelos más frecuentes son los mismos en las distintas especies y localidades. Si hablamos de las frecuencias genotípicas podemos encontrar diferencias importantes entre las diversas combinaciones de alelos. En *B. trimera* el loci PRX-1 el genotipo más frecuente fue heterocigoto (0,639), en cambio en *B. crispa* son los homocigotos correspondientes a los dos alelos encontrados (0,513 y 0,359 para los alelos 1 y 2 respectivamente). En el loci PRX-2 se detectó una situación similar aunque es menester resaltar que el genotipo más frecuente en ambas especies es el mismo (patrón de bandas heterocigotos 1/2 con frecuencias de 0,472 y 0,3 para las dos especies citadas anteriormente), a pesar de que en *B. crispa* se observa mayor cantidad de homocigotos (0,5) que en *B. trimera*. (0,08). En el PRX-3 por el contrario en

ambas especies el genotipo más frecuente es el heterocigoto (0,4). En MDH-1 la situación es comparable a la observada en PRX-2 donde los genotipos homocigotos ( $1/1=0,1$ ,  $2/2=0,35$ ,  $3/3=0,15$ ) predominan en *B. crispa* y los heterocigotas ( $1/2=0,325$ ,  $2/3=0,25$ ) en *B. trimera*. Para el locus de MDH-2 se observan más variabilidad de genotipos en *B. crispa* (en *B. trimera* no se observaron muestras con genotipo homocigoto 1/1 ni heterocigoto 1/3).

Respecto a los valores calculados para establecer las diferencias significativas entre las frecuencias genotípicas observadas y las esperadas, observamos que la mayoría de los loci estudiados no se encuentran en equilibrio H-W, únicamente en el locus PRX-3 tanto en *Baccharis trimera* como en *B. crispa* la hipótesis nula no fue rechazada por lo que podemos asumir que se encontraría en equilibrio H-W, además en *B. trimera* el locus PRX-1 tampoco presentó diferencias significativas entre las frecuencias esperadas y las que se observaron. De cualquier forma la mayor parte de los locus analizados no se encuentran en equilibrio de H-W según lo esperado para este modelo, lo que sugiere que alguna de las premisas impuestas por el mismo no se cumplen estrictamente lo cual sería una explicación en las diferencias de frecuencias encontradas (Tablas 5 y 6).

Los niveles de variabilidad estimados a partir de las frecuencias alélicas con valores promedio de heterocigosidad observada de 0,436 para *B. crispa* y 0,624 para *B. trimera* son considerados altos respecto a los observados en poblaciones naturales de *B. trimera* del Sur de Brasil con valor promedio de 0,217 (Frizon, 2004). También los valores de heterocigosidad esperada de acuerdo a la hipótesis de equilibrio Hardy-Weinberg fueron promediados para *B. crispa* 0,573 y *B. trimera* 0,569 siendo considerados también elevados respecto a los esperados en *B. trimera* (0,215) por Frizon (2004). Estos valores también son altos comparados con la heterocigosidad esperada promedio para 655 especies de plantas presentado por Berg & Hamrick (1997) con valores esperados entre 0,05 y 0,25.

La heterocigosidad media observada en *B. trimera* en la localidad Salto del Penitente (Depto. de Lavalleya) fue de 0,624, valor superior al encontrado en las muestras provenientes de los sitios de colectas situados en el Km. 29.500 de la Ruta 60 en el Depto. de Maldonado, estudiadas por Carrocio (2011) donde dicho valor fue de 0,465; contrariamente en PRX-3 que presentó un valor similar al de la subpoblación de Salto del Penitente (0,513 y 0,521 respectivamente) y MDH-2 superior (0,575 y 0,37 respectivamente). En cuanto a *B. crispa* la heterocigosidad media observada fue mayor (0,436 y 0,395 en Depto. Maldonado) pero en general en las muestras provenientes de este sitio (Km. 29.500 Ruta 60) comparadas a las provenientes del Depto. de Lavalleya (Salto del Penitente) aparecieron en algunos casos valores mayores (PRX-1, PRX-2), iguales (PRX-3)

y menores (MDH-1 y MDH-2). En la mayoría de los casos la heterocigosis observada ha sido mayor en *B. trimera* respecto a *B. crispa* (PRX-1, PRX-2, PRX-3 y MDH-1).

Considerando los valores de heterocigosis esperada ( $H_e$ ) para la hipótesis de equilibrio de Hardy -Weinberg los valores resultaron muy similares tanto entre las diferentes especies como también si se las compara con los datos de Carrocio (2011) provenientes de Maldonado (Tablas 5 y 6), siendo esto una consecuencia de que las frecuencias alélicas observadas también han sido semejantes entre las poblaciones estudiadas.

La variabilidad estimada a partir de la heterocigosis observada promedio fue mayor para las muestras de *B. trimera* (0,624) que para *B. crispa* (0,436); esto podría ser consecuencia que esta especie se ha adaptado a una mayor diversidad de ambientes lo que incidiría en la posibilidad de generar nuevas combinaciones genotípicas. Esta misma distribución de variabilidad genética entre especies de *Baccharis* también ocurrió en las muestras provenientes del Km. 29,500 de Ruta 60, Maldonado (Carrocio, 2011).

Loveless & Hamrick (1984) señalan que la historia de vida y otras características ecológicas de las especies son la fuente generadora de gran parte de la variabilidad que muestran las especies biológicas. En las carquejas podemos relacionar estas particularidades con la preferencia diferencial de las especies para ubicarse en los ecosistemas. Mientras que *B. trimera* se presenta en regiones abiertas tales como praderas e incluso en áreas suburbanas y urbanas, *B. crispa* ocurre en zonas mucho más áridas (Heiden, 2005); en las localidades que han sido muestreadas en diferentes estudios genéticos en Uruguay (Carrocio, 2011; Vaco, 2011), se las ha observado entre las rocas, incluso formando parte de pedregales, constatando la particularidad que *B. trimera* se extiende en una variedad mayor de hábitats respecto a *B. crispa*.

Todas estas observaciones, registros previos y resultados de análisis genéticos, permiten sugerir que *B. trimera* es mejor competidora y de cierto modo se adapta y extiende en diversos ambientes donde vive y se reproduce. Por tales motivos se espera que presente mayores valores de variabilidad, en sus variadas expresiones, respecto a *B. crispa*, con poblaciones más pequeñas y por tanto más vulnerables a la erosión génica debido a deriva genética por el pequeño tamaño de sus poblaciones que estarían restringidas a determinadas características del ambiente. Estas características biológicas y reproductivas llevarían a que las poblaciones se encuentren más aisladas genéticamente entre si lo que conllevaría a una menor variabilidad genética.

La variación entre las poblaciones naturales es producto de la interacción de diversos factores evolutivos tales como la selección, el tamaño efectivo poblacional y la capacidad potencial de diseminación de polen y semillas. Los dos primeros factores tienden a aumentar la diferenciación entre especies, y la capacidad de dispersión tiende a homogeneizar o disminuir la diferenciación entre las especies (Hamrick, 1989).

También en los mismos relevamientos genéticos y poblacionales efectuados en nuestro país se ha constatado que, el tamaño poblacional de *B. trimera* se observó superior al de *B. crispa* hecho que favorecería el incremento en la variabilidad, lo cual sumado a una posible mayor capacidad de dispersión y posibilidad de intercambio genético al mismo tiempo, conducirían a una reducción en la endogamia poblacional. Esto se ha visto reflejado en los índices de fijación  $F$  de Wright, con valores 0,309 para *B. crispa* y -0,0957 para *B. trimera*, indicando grados de endogamia diferentes y de tendencias opuestas en las especies, donde *B. trimera* muestra un exceso en los heterocigotas observados, *B. crispa* un déficit de los mismos, o lo que es igual presenta cierto grado de endogamia dentro de la muestra con la que se han realizado los estudios de este trabajo. Este parámetro  $F$  muestra en que grado se aleja la población estudiada en sus frecuencias genotípicas observadas respecto a las esperadas si los componentes de la muestra que hemos analizados se aparearan al azar con frecuencias alélicas iniciales iguales (Allendorf & Luikart, 2007).

Los valores de los parámetros descriptivos  $F$  de Wright, son indicadores de diversas características de las muestras biológicas que se analizan. El  $F_{IS}$  negativo es un indicador de exceso de heterocigotos, debido por ejemplo a tamaños poblacionales efectivos pequeños, y si resulta en valores positivos es indicador de déficit de heterocigotas producidos factiblemente por endogamia (Allendorf & Luikart, 2007).

Los valores de  $F_{ST}$  observados indican la existencia de una muy baja diferenciación genética entre las muestras provenientes de diferentes sitios de colecta, en comparación a los valores esperados para especies diferentes por Ward *et al.* (1992). Estos datos sugieren por lo tanto, que en realidad no se trata de estructuras reproductivas diferentes (subpoblaciones) estrictamente hablando, ya que no se obtuvieron valores significativos de divergencia genética entre estas muestras de *B. trimera* y *B. crispa* procedentes de los Deptos de Lavalleja y Maldonado. También podrían interpretarse estos valores como indicadores de existencia significativa de flujo genético entre los mencionados sitios, lo que nos sugiere que estamos analizando localidades donde se ubicaron muestras de carquejas (subpoblaciones) que forman parte de un conjunto de muestras de mayor tamaño geográfico (población total) dentro de las cual se dan intercambios genéticos para cada una de las especies.

Los niveles de variabilidad han resultado ser altos en este análisis con marcadores isoenzimáticos pero es menester recalcar dos aspectos: 1) la naturaleza de los mismos hace que reflejen una parte de la variabilidad, la cual se expresa en variantes enzimáticas; 2) solamente se emplearon dos sistemas isoenzimáticos que representaron en total cinco loci, lo cual es bajo respecto al número de loci analizados en otros estudios de este tipo y por esta razón no es posible aseverar con certeza que estos niveles estén acordes en el verdadero nivel de variación de estas especies.

Aplicando marcadores ISSR en muestras provenientes de los dos sitios mencionados en este trabajo, y un tercero situado en la Sierra de Carapé (Lavalleja, ver Anexo VII), Vaco (2011) detectó niveles similares de variabilidad genética para *B. trimera* ( $F_{ST}=0,07$ ) y *B. crispa* ( $F_{ST}=0,04$ ). Estos valores son similares a los obtenidos en este trabajo y refuerzan la hipótesis que la variación a nivel proteico siempre será menor puesto que no todos los cambios a nivel de secuencia de ADN serán observables a nivel fenotípico y además los fragmentos amplificados no están sujetos a selección lo que permite la detección de mayor variabilidad. También pueden producirse cambios en la secuencia de ADN que no sean detectados por electroforesis ya sea por mutaciones sinónimas o por cambios de aminoácidos con igual carga (Ayala, 1972).

Por otra parte también podrían estudiarse paralelamente otras poblaciones de diferentes localidades a modo de amplificar y generalizar la información acerca de las especies en nuestro país, de modo que además se monitoree el estado de las poblaciones para su preservación. Incrementar el número de poblaciones así como también de sistemas isoenzimáticos analizados generará información de mayor representatividad.

Los patrones de diversidad y los índices de variabilidad, están íntimamente relacionados con la capacidad de adaptación de las especies a cambios en el entorno. Es imprescindible que se preserve la diversidad genética para mantener poblaciones "saludables". Para la conservación de *Baccharis trimera* y *Baccharis crispa* sería necesario llevar a cabo estudios periódicos y controlados que permitan conocer el impacto de las colectas en las poblaciones naturales, y observar los valores obtenidos de los indicadores de diversidad y variabilidad para poder evaluar la implicancia de la explotación. La disminución del tamaño poblacional además de ser un efecto reductor intrínseco (generalmente toda la planta es extraída para su comercialización) es también una forma en la que decrecen las variantes biológicas (morfológicas, fisiológicas, genéticas) que podrán ser combinadas durante la reproducción sexual, dejando menos genotipos disponibles para la próxima generación lo que disminuye las posibilidades de adaptación a diferentes nichos ecológicos; por otro lado,

indirectamente, de acuerdo con la teoría evolutiva neutralista, aumenta el efecto de la deriva genética ya que la probabilidad de fijación de un alelo aumenta al disminuir el tamaño efectivo de la población (Nei, 1973). Por tanto creemos que mantener los niveles de variación existentes debe ser uno de los objetivos del plan de manejo a fines de no reducir la adaptabilidad de las especies a cambios ambientales o aumentar su susceptibilidad a enfermedades.

## CONSIDERACIONES FINALES

En las poblaciones estudiadas de *Baccharis trimera* y *Baccharis crispa* de Uruguay se confirma el número cromosómico de  $2n=18$  en núcleos somáticos, así como el carácter diploide de la especie. Los cariotipos de ambas especies no son diferenciables con las técnicas citogenéticas utilizadas, tinción convencional con orceína y análisis de cariotipos en prometafase y en metafase. Sin embargo para extraer conclusiones es necesario continuar aplicando otros análisis de laboratorio, como los denominados BAC-FISH. Vaio *et al.* (2008) realizaron estudios sobre varias especies del género y no pudieron establecer diferencias a nivel citogenético, realizando bandeado diferencial CMA/DAPI así como fluorescencia de hibridación *in situ* con sondas de ADN ribosomal, tanto 5S como 45S. Por el contrario, los mismos autores pudieron establecer diferencias en el contenido de ADN nuclear (valor 2C) entre *B. trimera* y *B. Crispa*, siendo para estas especies 2,89 pg y 3,46 pg respectivamente.

En cuanto a los marcadores isoenzimáticos utilizados en este trabajo, no permitieron diferenciar *Baccharis trimera* de *Baccharis crispa* en las poblaciones seleccionadas en este trabajo, ya que no fueron encontrados alelos fijados en una población y ausentes en la otra, o dicho de otra forma todos los alelos estudiados son compartidos por ambas especies. Una posibilidad sería estudiar mayor número de marcadores isoenzimáticos o aumentar el número de individuos muestreados y tejidos analizados para incrementar la variabilidad a fines de encontrar alelos específicos. Por otra parte la expansión de territorio muestreado aumentado la cantidad de subpoblaciones muestreadas no sólo sería más representativa de los recursos fitogenéticos presentes en el país, sino que también sería de esperarse que aumentara la variación génica presente. La cantidad de sistemas de enzimas analizados representa un factor clave al momento del análisis de frecuencias alélicas utilizando estos marcadores, muchas veces se presentan locus con alelos únicos que pueden caracterizar incluso poblaciones de diferentes localidades dentro de la misma especie (Frizon, 2004).

Debido a la necesidad de conservación del germoplasma de ambas especies debido principalmente a su potencial utilización terapéutica, sería recomendable la introducción de estas especies en cultivos locales que permitan la comercialización de las mismas evitando el riesgo de la erosión en su acervo genético. De esta forma no sólo se preserva el estado natural de *Baccharis trimera* (Less.) y *Baccharis crispa* Spreng. sino que además se genera la posibilidad de alternativas productivas con especies nativas en nuestro país.

## LITERATURA CITADA

**Abad M. & Bermejo P. 2007.** *Baccharis* (Compositae): a review update. ARKIVOC 7 76-96.

**Allendorf F. & Luikart G. 2007.** Conservation and the genetics of populations. Ed. Blackwell. United Kingdom. 663 pp.

**Ayala F., Powell J., Tracey M., Mourao C., Pérez-Salas S. 1972.** Enzyme variability in the *Drosophila willistoni* group. IV. Genic variation in natural populations of *Drosophila willistoni*. Genetics 70 113-139.

**Berg E. & Hamrick J. 1997.** Quantification of genetic diversity at allozyme loci. Canada Journal for research 27 415-424.

**Carreira C. 2007.** *Baccharis trimera* (Less.) DC. (Asteraceae): estudo comparativo dos óleos voláteis, atividade biológica e crescimento de estacas de populações ocorrentes em áreas de Cerrado e Mata Atlântica. Tesis São Paulo, Brasil. 199 pp.

**Carroccio M. 2011.** Caracterización genética a partir de marcadores moleculares de *Baccharis trimera* y *Baccharis crispa* (Asteraceae), especies de carquejas utilizadas con fines medicinales en Uruguay. Tesis de grado. Universidad de la República. Montevideo, Uruguay. 62 pp.

**Cortadi A., Di Sapio O., Mc Cargo J., Scandizzi A., Gattuso S. & Gattuso M. 1999.** Anatomical studies of *Baccharis articulata*, *Baccharis crispa* and *Baccharis trimera*, carquejas used in "folk medicine". Pharmaceutical Biology 37 357-365.

**Davies P. 2004.** Estudios en domesticación y cultivo de especies medicinales y aromáticas nativas. Serie técnica FPTA-INIA 11 Editor: Ing. Agr. Davies P. Montevideo, Uruguay. 229 pp.

**De Souza-Chies T. 1992.** Relacionamiento isoenzimático entre entidades taxonômicas do gênero *Paspalum* (Gramineae). Dissertação ao curso de Bacharelado em Ciências Biológicas. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, Brasil. 176 pp.

**Frizon N. 2004.** Distribuição da variabilidade genética em populações naturais de *Baccharis trimera* (Less.) DC. (Carqueja) no Sul do Brasil. Universidade Federal de Santa Maria. Rio Grande do Sul, Brasil. 125pp.

**Giuliano D. 2001.** Clasificación infragenérica de las especies argentinas de *Baccharis* (Asteraceae, Astereae ). Darwiniana **39** 131-154.

**Guerra M. 2000.** Patterns of heterochromatin distribution in plant chromosomes. Genet. Molec. Biol. **23** 1029-1041.

**Hamrick J. L. 1989.** Isozymes and analyses of genetic structure of plants populations. Isozymes in plant biology, Ed. Douglas E. Soltis. Chapter 4. Oregon, USA. pp. 87-105.

**Hardy G. 1908.** Mendelian proportions in a mixed population. Science **28** 49-50.

**Hartl D. & Clark A. 1997.** Principles of populations genetics. Ed. Sinauer Associates, Inc. Canada. 278 pp.

**Heiden G. 2005.** O gênero *Baccharis* L. seção *Caulopterae* DC. (Asteraceae) no Rio Grande do Sul. Tesis Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, Brasil. 238 pp.

**Heiden G., Vieira J., Bobrowski V. & Macias L. 2007.** Biogeografia de *Baccharis. Caulopterae* (Asteraceae) no Rio Grande do Sul, Brasil. Rodriguésia **58** 787-796.

**Heiden G. & Baumgratz J. 2009.** New species of *Baccharis* (Asteraceae: Astereae) from Rio de Janeiro, Southeastern Brazil. Journal Bot. Res. Inst. Texas **3** 139-145.

**Hunziker J., Wulff A. & Escobar A. 2002.** Permanent translocation heterozygosity in dioecious *Baccharis coridifolia* DC. (Asteraceae). Hereditas **137** 132-139.

**Jeffrey C. 2006.** Compositae. Introduction with keys to tribes. Springer, Berlin. **8** 61-77.

**Lago J., Romoff P., Fávero O., Souza F., Soares M., Baraldi P. & Corrêa A. 2008.** Chemical composition of male and female *Baccharis trimera* (Less.) DC. (Asteraceae) essential oils. Biochemical Systematics and Ecology **36** 737-740.

**Lessa E. 2004.** Guía de estudio de genética de poblaciones. Ed. Laboratorio de Evolución. Facultad de Ciencias. Montevideo, Uruguay. 75 pp.

**Levan A., Fredga K. & Sandberg AA. 1964.** Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* **52** 201-220.

**Litovsky M., Merlo A., Evangelista J., Laureano L. & Guião M. 2005.** Plantas Medicinales de América del Sur: diálogo de saberes para la sustentabilidad. Editor: Red de Plantas medicinales de América del Sur. Montevideo, Uruguay. 15 pp.

**Lonni A., Scarminio I., Silva L. & Ferreira D. 2005.** Numerical taxonomy characterization of *Baccharis* Genus species by ultravioleta-visible spectrophotometry. *Analytical Sciences* **21** 235-239.

**Loveless, M. & Hamrick J. 1984.** Ecological determinants of genetic structure in plant populations. *Annual Review of Ecology and Systematics* **15** 65-95.

**Manchenko G. 2003.** Handbook of detection of enzymes on electrophoretic gels. Ed. CRC Press, USA. 570 pp.

**Mangiaterra P. 2005.** Evaluación de parámetros botánicos y fitoquímicos para el control de calidad de "carqueja" Tesina. Facultad de Ciencias exactas y naturales, Universidad de Belgrano. Buenos Aires, Argentina. 48 pp.

**Markert C. & Möller F. 1959.** Multiple forms of enzymes: tissue, ontogenic, and species specific patterns. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **45** 753-763.

**Mast H. 1975.** The organization and Work of UPOV. *Seed Science Technology* **3** 377-386.

**Nei M. 1973.** Analysis of gene Diversity in subdivided populations. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **70** 321-323.

**Nesom G. 2000.** Generic conspectus of the tribe Astereae (Asteraceae) in North America, Central America, the Antilles and Hawaii. *Sida Botanical Miscellany* **20** 1-100.

**Paul E., Lunardelli A., Caberlon E., de Oliveira C., Santos R., Biolchi V, Bastos C., Moreira K., Nunes F., Gosmann G. & de Oliveira J. 2009.** Anti-inflammatory and immunomodulatory effects of *Baccharis trimera* aqueous extract on induced pleurisy in Rats and Lymphoproliferation *in vitro*. *Inflammation*. Publicado online **6** 419-425.

**Petenatti E., Petenatti M., Cifuentes D., Gianello J., Giordano O., Tonn C. & Del Vitto L. 2007.** Medicamentos herbarios en el Centro-Oeste argentino. VI. Caracterización y control de calidad de dos especies de "carquejas": *Baccharis sagittalis* y *B. triangularis* (Asteraceae). *Lat. Am. J. Pharm.* **26** 201-208.

**Scandalios G. 1969.** Genetic control of multiple molecular forms of enzymes in plants: A review. *Biochemical Genetics* **3** 37-79.

**Shaw C. & Prasad R. 1970.** Starch gel electrophoresis of enzymes: a compilation of recipes. *Biochemical Genetics* **4** 297-320.

**Speranza P., Vaio M. & Mazzella C. 2003.** Karyotypes of two cytotypes of *Paspalum quadrifarium* Lam. (Poaceae). An alternative technique for small chromosomes in plants. *Genet. Molec. Biol.* **26** 499-503.

**Ramírez H. 2003.** Uso de isoenzimas en la caracterización de germoplasma vegetal. *Facultad de Ciencias Agropecuarias* **1** 80-82.

**Rodríguez M., Gattuso S. & Gattuso M. 2008.** *Baccharis crispa* y *Baccharis trimera* (Asteraceae): Revisión y nuevos aportes para su normalización micrográfica. *Latin American Journal of Pharmacy* **27** 387-397.

**Vaco A. 2011.** Variabilidad molecular y flujo génico entre 2 especies de carquejas del Uruguay. Tesis de grado Universidad de la República. Montevideo, Uruguay. 35 pp.

**Vaio M., Rodríguez M., Mazzella C., López-Carro B., Santiñaque F., Carrocio I., Díaz C., Pereira J., Bonifacino M., Speranza P. & Folle G. 2008.** Análisis cromosómicos, isoenzimáticos y de contenido de ADN en Carquejas y Marcelas. Primeras jornadas de la Sociedad Uruguaya de Genética (SUG). Montevideo, Uruguay. Resumen y Panel.

**Van der Bank H., Van der Bank M. & Van Wick B. 2001.** A review of the use of allozyme electrophoresis in plants systematics. *Biochemical Systematics and Ecology* **29** 469-483.

**Verdi L., Costa I. & Pizzolatti M. 2005.** Género *Baccharis* (Asteraceae): Aspectos químicos, económicos e biológicos. *Quim. Nova* **28** 85-94.

**Villamil J. 2004.** En: Aportes para el desarrollo del sector de plantas medicinales y aromáticas en el Uruguay. Editores: Fundaquim, Red

Propymes, UruTec, Fundasol y Cooperación técnica alemana (GTZ).  
Montevideo, Uruguay. 134 pp.

**Villamil J. & Bonnacarrère V. 2005.** Nuevos enfoques en el campo de las plantas aromáticas y medicinales: la producción de fitoterápicos. *Revista INIA* **5** 43-46.

**Ward R., Skibinski D. & Woodwark M. 1992.** Protein heterozygosity, protein structure, and taxonomic differentiation. *Evolutionary Biology* **26** 73-160.

**Wendel J. & Weeden N. 1989.** Visualization and interpretation of plant isozymes *Isozymes in plant biology*, Edited by Douglas E. Soltis. Chapter 1.

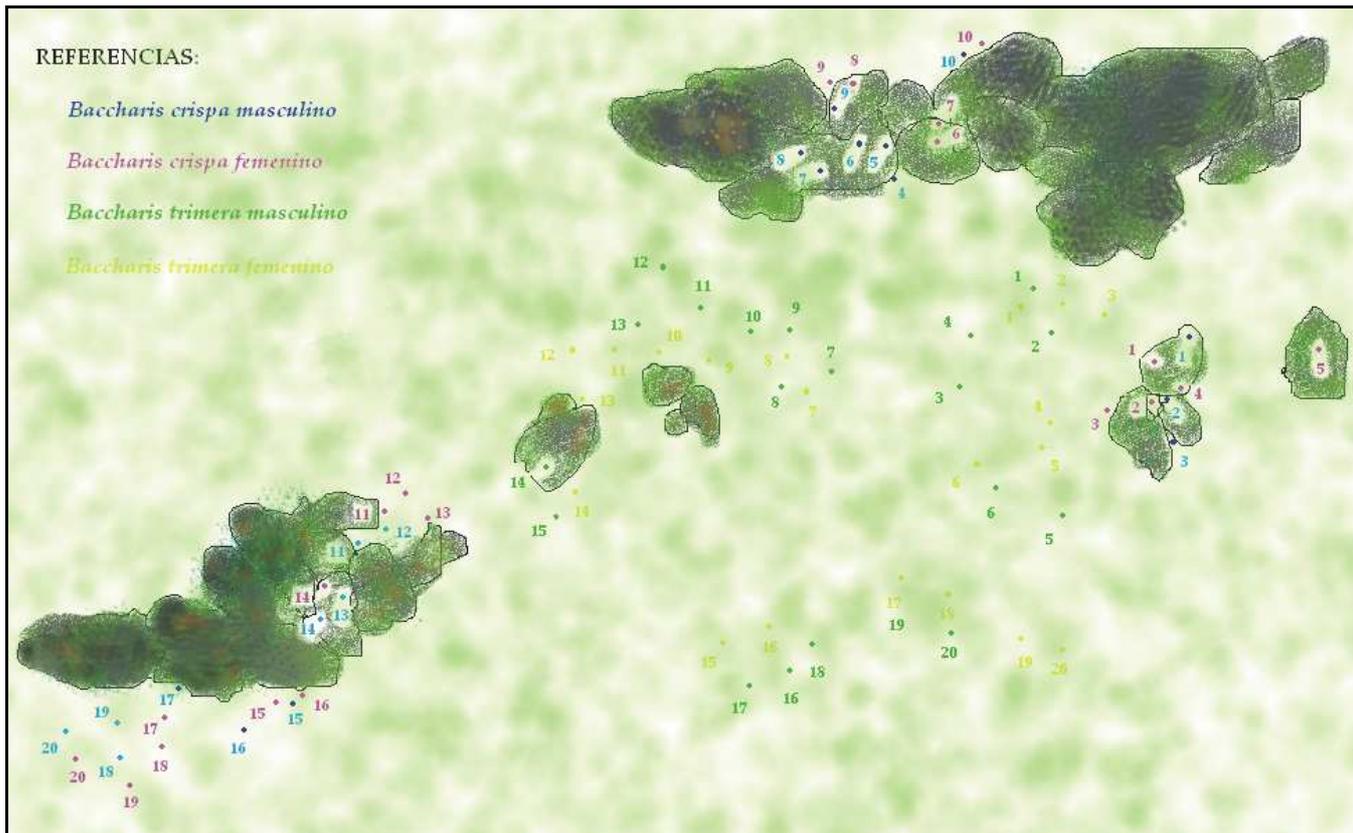
**Wright S. 1965.** The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to Systems of mating. *Evolution* **19** 395-420.

**Zeidler M. 2000.** Electrophoretic analysis of plant isozymes. *Biologica* **38** 7-16.

## ANEXOS

### ANEXO I.

Diagrama esquemático de la posición relativa de los individuos muestreados para el análisis isoenzimático. Salto del Penitente, Departamento de Lavalleja tanto de *Baccharis trimera* (Less.) DC. como de *Baccharis crispa* (Spreng.) .



## ANEXO II.

Detalle de colecta de individuos vivos que fueron integrados a la colección del Invernáculo del Dpto. de Genética en la Facultad de Agronomía de especímenes de *Baccharis trimera* (Less.) DC. y *Baccharis crispa* (Spreng.)

Código	Especie	Sexo	Procedencia	Fecha	Colectores
5	<i>B. trimera</i>	Femenino	Penitente	14/04/2008	Carrocio, Díaz, Pereira y Vaio
9	<i>B. trimera</i>	Femenino	Penitente	14/04/2008	Carrocio, Díaz, Pereira y Vaio
11	<i>B. trimera</i>	Femenino	Penitente	14/04/2008	Carrocio, Díaz, Pereira y Vaio
A	<i>B. trimera</i>	Masculino	Penitente	14/04/2008	Carrocio, Díaz, Pereira y Vaio
4	<i>B. trimera</i>	Masculino	Penitente	14/04/2008	Carrocio, Díaz, Pereira y Vaio
3	<i>B. crispa</i>	Femenino	Penitente	14/04/2008	Carrocio, Díaz, Pereira y Vaio
2	<i>B. crispa</i>	Femenino	Penitente	14/04/2008	Carrocio, Díaz, Pereira y Vaio
6	<i>B. crispa</i>	Femenino	Penitente	14/04/2008	Carrocio, Díaz, Pereira y Vaio
1	<i>B. crispa</i>	Masculino	Penitente	14/04/2008	Carrocio, Díaz, Pereira y Vaio
7	<i>B. crispa</i>	Masculino	Penitente	14/04/2008	Carrocio, Díaz, Pereira y Vaio
8	<i>B. crispa</i>	Masculino	Penitente	14/04/2008	Carrocio, Díaz, Pereira y Vaio
10	<i>B. crispa</i>	Masculino	Penitente	14/04/2008	Carrocio, Díaz, Pereira y Vaio
115	<i>B. crispa</i>	Femenino	Penitente	24/03/2009	Díaz, Pereira y Rodríguez
116	<i>B. crispa</i>	Masculino	Penitente	24/03/2009	Díaz, Pereira y Rodríguez
117	<i>B. crispa</i>	Femenino	Penitente	24/03/2009	Díaz, Pereira y Rodríguez
118	<i>B. crispa</i>	Femenino	Penitente	24/03/2009	Díaz, Pereira y Rodríguez
119	<i>B. crispa</i>	Masculino	Penitente	24/03/2009	Díaz, Pereira y Rodríguez
120	<i>B. trimera</i>	Femenino	Penitente	24/03/2009	Díaz, Pereira y Rodríguez
121	<i>B. trimera</i>	Masculino	Penitente	24/03/2009	Díaz, Pereira y Rodríguez
122	<i>B. trimera</i>	Masculino	Penitente	24/03/2009	Díaz, Pereira y Rodríguez
123	<i>B. trimera</i>	Femenino	Penitente	24/03/2009	Díaz, Pereira y Rodríguez
124	<i>B. trimera</i>	Masculino	Penitente	24/03/2009	Díaz, Pereira y Rodríguez
125	<i>B. trimera</i>	Femenino	Penitente	24/03/2009	Díaz, Pereira y Rodríguez

### ANEXO III.

Detalle de individuos de *Baccharis trimera* (Less.) DC. y *Baccharis crispa* (Spreng.) colectados para el análisis isoenzimático y almacenados a -20° C en el Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Agronomía.

Código	Especie	Sexo	Muestras
T1♀	<i>B. trimera</i>	Femenino	Tallos, preservados a -30°C
T2♀	<i>B. trimera</i>	Femenino	Tallos, preservados a -30°C
T3♀	<i>B. trimera</i>	Femenino	Tallos, preservados a -30°C
T4♀	<i>B. trimera</i>	Femenino	Tallos, preservados a -30°C
T5♀	<i>B. trimera</i>	Femenino	Tallos, preservados a -30°C
T6♀	<i>B. trimera</i>	Femenino	Tallos, preservados a -30°C
T7♀	<i>B. trimera</i>	Femenino	Tallos, preservados a -30°C
T8♀	<i>B. trimera</i>	Femenino	Tallos, preservados a -30°C
T9♀	<i>B. trimera</i>	Femenino	Tallos, preservados a -30°C
T10♀	<i>B. trimera</i>	Femenino	Tallos, preservados a -30°C
T11♀	<i>B. trimera</i>	Femenino	Tallos, preservados a -30°C
T12♀	<i>B. trimera</i>	Femenino	Tallos, preservados a -30°C
T13♀	<i>B. trimera</i>	Femenino	Tallos, preservados a -30°C
T14♀	<i>B. trimera</i>	Femenino	Tallos, preservados a -30°C
T15♀	<i>B. trimera</i>	Femenino	Tallos, preservados a -30°C
T16♀	<i>B. trimera</i>	Femenino	Tallos, preservados a -30°C
T17♀	<i>B. trimera</i>	Femenino	Tallos, preservados a -30°C
T18♀	<i>B. trimera</i>	Femenino	Tallos, preservados a -30°C
T19♀	<i>B. trimera</i>	Femenino	Tallos, preservados a -30°C
T20♀	<i>B. trimera</i>	Femenino	Tallos, preservados a -30°C
T1♂	<i>B. trimera</i>	Masculino	Tallos, preservados a -30°C
T2♂	<i>B. trimera</i>	Masculino	Tallos, preservados a -30°C
T3♂	<i>B. trimera</i>	Masculino	Tallos, preservados a -30°C
T4♂	<i>B. trimera</i>	Masculino	Tallos, preservados a -30°C
T5♂	<i>B. trimera</i>	Masculino	Tallos, preservados a -30°C
T6♂	<i>B. trimera</i>	Masculino	Tallos, preservados a -30°C
T7♂	<i>B. trimera</i>	Masculino	Tallos, preservados a -30°C
T8♂	<i>B. trimera</i>	Masculino	Tallos, preservados a -30°C
T9♂	<i>B. trimera</i>	Masculino	Tallos, preservados a -30°C
T10♂	<i>B. trimera</i>	Masculino	Tallos, preservados a -30°C
T11♂	<i>B. trimera</i>	Masculino	Tallos, preservados a -30°C
T12♂	<i>B. trimera</i>	Masculino	Tallos, preservados a -30°C
T13♂	<i>B. trimera</i>	Masculino	Tallos, preservados a -30°C
T14♂	<i>B. trimera</i>	Masculino	Tallos, preservados a -30°C
T15♂	<i>B. trimera</i>	Masculino	Tallos, preservados a -30°C
T16♂	<i>B. trimera</i>	Masculino	Tallos, preservados a -30°C
T17♂	<i>B. trimera</i>	Masculino	Tallos, preservados a -30°C
T18♂	<i>B. trimera</i>	Masculino	Tallos, preservados a -30°C

T19♂	<i>B. trimera</i>	Masculino	Tallos, preservados a -30°C
T20♂	<i>B. trimera</i>	Masculino	Tallos, preservados a -30°C
C1♀	<i>B. crispa</i>	Femenino	Tallos, preservados a -30°C
C2♀	<i>B. crispa</i>	Femenino	Tallos, preservados a -30°C
C3♀	<i>B. crispa</i>	Femenino	Tallos, preservados a -30°C
C4♀	<i>B. crispa</i>	Femenino	Tallos, preservados a -30°C
C5♀	<i>B. crispa</i>	Femenino	Tallos, preservados a -30°C
C6♀	<i>B. crispa</i>	Femenino	Tallos, preservados a -30°C
C7♀	<i>B. crispa</i>	Femenino	Tallos, preservados a -30°C
C8♀	<i>B. crispa</i>	Femenino	Tallos, preservados a -30°C
C9♀	<i>B. crispa</i>	Femenino	Tallos, preservados a -30°C
C10♀	<i>B. crispa</i>	Femenino	Tallos, preservados a -30°C
C11♀	<i>B. crispa</i>	Femenino	Tallos, preservados a -30°C
C12♀	<i>B. crispa</i>	Femenino	Tallos, preservados a -30°C
C13♀	<i>B. crispa</i>	Femenino	Tallos, preservados a -30°C
C14♀	<i>B. crispa</i>	Femenino	Tallos, preservados a -30°C
C15♀	<i>B. crispa</i>	Femenino	Tallos, preservados a -30°C
C16♀	<i>B. crispa</i>	Femenino	Tallos, preservados a -30°C
C17♀	<i>B. crispa</i>	Femenino	Tallos, preservados a -30°C
C18♀	<i>B. crispa</i>	Femenino	Tallos, preservados a -30°C
C19♀	<i>B. crispa</i>	Femenino	Tallos, preservados a -30°C
C20♀	<i>B. crispa</i>	Femenino	Tallos, preservados a -30°C
C1♂	<i>B. crispa</i>	Masculino	Tallos, preservados a -30°C
C2♂	<i>B. crispa</i>	Masculino	Tallos, preservados a -30°C
C3♂	<i>B. crispa</i>	Masculino	Tallos, preservados a -30°C
C4♂	<i>B. crispa</i>	Masculino	Tallos, preservados a -30°C
C5♂	<i>B. crispa</i>	Masculino	Tallos, preservados a -30°C
C6♂	<i>B. crispa</i>	Masculino	Tallos, preservados a -30°C
C7♂	<i>B. crispa</i>	Masculino	Tallos, preservados a -30°C
C8♂	<i>B. crispa</i>	Masculino	Tallos, preservados a -30°C
C9♂	<i>B. crispa</i>	Masculino	Tallos, preservados a -30°C
C10♂	<i>B. crispa</i>	Masculino	Tallos, preservados a -30°C
C11♂	<i>B. crispa</i>	Masculino	Tallos, preservados a -30°C
C12♂	<i>B. crispa</i>	Masculino	Tallos, preservados a -30°C
C13♂	<i>B. crispa</i>	Masculino	Tallos, preservados a -30°C
C14♂	<i>B. crispa</i>	Masculino	Tallos, preservados a -30°C
C15♂	<i>B. crispa</i>	Masculino	Tallos, preservados a -30°C
C16♂	<i>B. crispa</i>	Masculino	Tallos, preservados a -30°C
C17♂	<i>B. crispa</i>	Masculino	Tallos, preservados a -30°C
C18♂	<i>B. crispa</i>	Masculino	Tallos, preservados a -30°C
C19♂	<i>B. crispa</i>	Masculino	Tallos, preservados a -30°C
C20♂	<i>B. crispa</i>	Masculino	Tallos, preservados a -30°C

## ANEXO IV.

Distintas soluciones utilizadas.

### Buffer de extracción de proteínas (200 mL de solución final)

Tris-HCl 50 mM	1,211 g
KCl 10 mM	149 mg
MgCl <sub>2</sub> . 6 H <sub>2</sub> O 10 mM	406 mg
EDTA 1mM	74,44 mg
β-mercaptoetanol 14 mM (adicionar al usar: 9,8 μL en 10 mL de solución)	
pH=7,6 (ajustar con HCl)	

### Corrida Electroforética

#### Sistema PRX (Disolución de imbibición 1:7)

Corrida a 200 V, temperatura ambiente durante 45 minutos.

#### Buffer Tris-Citrato (1 L de solución final)

Tris 0,155 M	16,35 g
Ácido cítrico 0,043 M	9,04 g
pH=7,0	

#### Sistema MDH (Disolución de imbibición 1:4)

Corrida a 200 V, refrigerando durante 25 minutos.

#### Buffer III SHAW-PRASSAD (1 L de solución final)

Tris 0,5 M	60,6 g/L
Ácido bórico	40,4 g/L
EDTA	6,0 g/L
pH=8,0	

### Sistemas de revelado diluidos en gel de agarosa

(agarosa 0,24 g y agua 20 mL) a 37° C durante tiempo variable.

#### PRX

CaCl <sub>2</sub> 0,1 M	200 μL
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (30 %)	20 μL
Amino etil carbazol	(~ 15 mg)
Dimetilformamida (DMF)	1 mL
Acetato de sodio 0,2 M pH 5,0	9,0 mL

#### MDH

Tris-HCl 0,5 M pH=8,0	9 mL
Ácido málico 0,5 M pH=7,0	2,5 mL
β-NAD (40 mg/mL)	200 μL
NBT (25 mg/mL)	200 μL
PMS (30 mg/mL)	100 μL

## ANEXO V.

Detalle de las medidas cromosómicas realizadas en cariotipos de *Baccharis trimera* (Less.) DC. y *Baccharis crispa* (Spreng.). Se indican los valores en  $\mu\text{m}$  para cada brazo p y q de los cromosomas homólogos así como el total. También aparecen los promedios calculados para cada especie en cada cromosoma resaltados en color naranja. Para el cromosoma 3 en particular, entre paréntesis se indica la medida del satélite de cromatina en los casos en que el mismo se presentó.

Aparecen también resaltados en color amarillo los índices centroméricos calculados para cada cromosoma en cada especie.

<i>B. trimera</i> 125a																
Cromosoma	1 1'		2 2'		3 3'		4 4'		5 5'		6 6'		7 7'		8 8'	
Brazo p	1,42	1,39	1,18	1,16	1,15	1,17	1,38	1,4	1,6	0,91	0,83	0,83	1,11	0,91	1,19	1,22
Brazo q	2,58	2,69	2,32	2,41	2,25	2,22	1,97	1,99	2,06	2,1	2,07	2,27	1,8	1,94	1,3	1,45
<b>Total</b>	<b>4</b>	<b>4,08</b>	<b>3,5</b>	<b>3,57</b>	<b>3,4</b>	<b>3,39</b>	<b>3,35</b>	<b>3,39</b>	<b>3,66</b>	<b>3,01</b>	<b>2,9</b>	<b>3,1</b>	<b>2,91</b>	<b>2,85</b>	<b>2,49</b>	<b>2,67</b>
Promedios	1,41		1,17		1,16		1,39		1,26		0,83		1,01		1,21	
	2,64		2,37		2,24		1,98		2,08		2,17		1,87		1,38	
<b>Total</b>	<b>4,04</b>		<b>3,54</b>		<b>3,4</b>		<b>3,37</b>		<b>3,34</b>		<b>3</b>		<b>2,88</b>		<b>2,58</b>	
<i>B. trimera</i> 125b																
Cromosoma	1 1'		2 2'		3 3'		4 4'		5 5'		6 6'		7 7'		8 8'	
Brazo p	2,21	2,02	1,64	1,69	2,09	1,98	1,22	1,21	0,89	1,57	1,64	1,81	1,54	1,56	1,25	1,12
Brazo q	3,02	2,99	3,81	4,28	2,6	2,83	3,41	3,36	2,66	2,69	2,57	2,42	2,52	2,57	2,65	2,51
<b>Total</b>	<b>5,23</b>	<b>5,01</b>	<b>5,45</b>	<b>5,97</b>	<b>4,69</b>	<b>4,81</b>	<b>4,63</b>	<b>4,57</b>	<b>3,55</b>	<b>4,26</b>	<b>4,21</b>	<b>4,23</b>	<b>4,06</b>	<b>4,13</b>	<b>3,9</b>	<b>3,63</b>
Promedios	2,12		1,67		2,04		1,22		1,57		1,73		1,55		1,19	
	3,01		4,05		2,72		3,39		2,68		2,5		2,55		2,58	
<b>Total</b>	<b>5,12</b>		<b>5,71</b>		<b>4,75</b>		<b>4,6</b>		<b>4,25</b>		<b>4,22</b>		<b>4,1</b>		<b>3,77</b>	
Promedio Total																
Brazo p	1,76		1,42		1,6		1,3		1,59		1,28		1,28		1,2	
Brazo q	2,82		3,21		2,48		2,68		2,38		2,33		2,21		1,98	
<b>Total</b>	<b>4,58</b>		<b>4,62</b>		<b>4,07</b>		<b>3,99</b>		<b>3,96</b>		<b>3,61</b>		<b>3,49</b>		<b>3,17</b>	
<b>IC B.</b>																
<i>trimera</i>	<b>38,43</b>	<b>M</b>	<b>30,67</b>	<b>SM</b>	<b>39,23</b>	<b>M</b>	<b>32,69</b>	<b>SM</b>	<b>37,21</b>	<b>SM</b>	<b>35,39</b>	<b>SM</b>	<b>36,7</b>	<b>SM</b>	<b>37,67</b>	<b>M</b>

<i>B. crispa</i>																
Cromosoma	1 1'		2 2'		3 3'		4 4'		5 5'		6 6'		7 7'		8 8'	
Brazo p	1,82	1,62	0,86	1,28	1,26	1,52	1,09	1,12	0,82	1,26	1,01	1,1	1,03	1,1	0,99	1,17
Brazo q	2,4	2,69	2,79	2,44	2,16	1,85	2,09	2,15	1,98	1,91	1,87	1,96	1,6	2,01	1,7	1,53
<b>Total</b>	<b>4,22</b>	<b>4,31</b>	<b>3,65</b>	<b>3,72</b>	<b>3,42</b>	<b>3,37</b>	<b>3,18</b>	<b>3,27</b>	<b>2,8</b>	<b>3,17</b>	<b>2,88</b>	<b>3,06</b>	<b>2,63</b>	<b>3,11</b>	<b>2,69</b>	<b>2,7</b>
Promedios	1,72		1,07		1,39		1,11		1,26		1,06		1,07		1,08	
	2,55		2,62		2,01		2,12		1,95		1,92		1,81		1,62	
<b>Total</b>	<b>4,27</b>		<b>3,69</b>		<b>3,4</b>		<b>3,23</b>		<b>3,21</b>		<b>2,97</b>		<b>2,87</b>		<b>2,7</b>	
<i>B. crispa</i>																
Cromosoma	1 1'		2 2'		3 3'		4 4'		5 5'		6 6'		7 7'		8 8'	
Brazo p	2,17	2,15	1,18	1,61	1,83	1,82	1,34	1,55	1,72	1,59	1,16	1,2	1,02	1,3	1,22	1,34
Brazo q	3,74	3,12	3,42	3,07	2,16	2,41	2,49	2,31	2,13	2,22	2,11	2,27	2,32	1,88	1,87	1,76
<b>Total</b>	<b>5,91</b>	<b>5,27</b>	<b>4,6</b>	<b>4,68</b>	<b>3,99</b>	<b>4,23</b>	<b>3,83</b>	<b>3,86</b>	<b>3,85</b>	<b>3,81</b>	<b>3,27</b>	<b>3,47</b>	<b>3,34</b>	<b>3,18</b>	<b>3,09</b>	<b>3,1</b>
Promedios	2,16		1,4		1,83		1,45		1,66		1,18		1,16		1,28	
	3,43		3,25		2,29		2,4		2,18		2,19		2,1		1,82	
<b>Total</b>	<b>5,59</b>		<b>4,64</b>		<b>4,11</b>		<b>3,85</b>		<b>3,83</b>		<b>3,37</b>		<b>3,26</b>		<b>3,1</b>	
Promedio Total																
Brazo p	1,94		1,23		1,61		1,28		1,14		1,12		1,11		1,18	
Brazo q	2,99		2,93		2,15		2,26		2,06		2,05		1,95		1,72	
<b>Total</b>	<b>4,93</b>		<b>4,16</b>		<b>3,75</b>		<b>3,54</b>		<b>3,2</b>		<b>3,17</b>		<b>3,07</b>		<b>2,9</b>	

IC *B. crispa* 39,37 M 29,61 SM 42,84 M 36,07 SM 35,68 SM 35,25 SM 36,3 SM 40,76 M 42

## ANEXO VI.

Cálculo del número medio de alelos por locus (A) para poblaciones de *Baccharis trimera* (Less.) DC. y *Baccharis crispa* (Spreng.)

Número medio de alelos por locus (A)

Total alelos/Total

locus

<i>B. crispa</i>	<i>B. trimera</i>
$(7+6)/5$	$(7+6)/5$
2,6	2,6

## ANEXO VII.

Localización de los 3 sitios de muestreo de poblaciones de *Baccharis trimera* (Less.) DC. y *Baccharis crispa* (Spreng.) estudiadas por Vaco (2011). Esquema extraído del mismo trabajo.

